

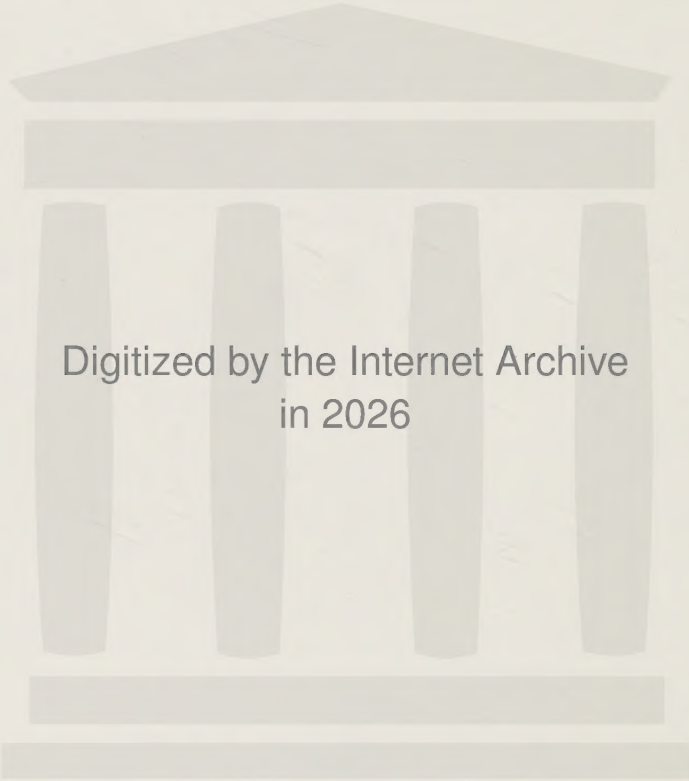
**DER EINFLUSS VON STRAHLENDOSIS UND
DOSISFRAKTIONIERUNG AUF DIE KNÖCHERNE
HEILUNG EINES DEFINIERTEN BOHRLOCHDEFEKTES
IM RATTENFEMUR**

MICHAEL ARNOLD

1988

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Strahlenbiologie der Gesellschaft
für Strahlen- und Umweltforschung Neuherberg

Direktor: Prof. Dr. U. Hagen

vorgelegt über: Prof. Dr. K. Tempel
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

DER EINFLUSS VON STRAHLENDOSIS UND DOSISFRAKTIONIERUNG
AUF DIE KNÖCHERNE HEILUNG EINES DEFINIERTEN
BOHRLOCHDEFEKTES IM RATTENFEMUR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

von
Michael Arnold
aus Saarbrücken

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 29.07.1988

Für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. K.-R. Trott.

Herrn Dr. J. Kummermehr möchte ich ganz herzlich für die Mitbetreuung, für informative Diskussionen und anregende Kritik danken.

Herrn Prof. Dr. K. Tempel danke ich herzlich für anregende Diskussionen und kritische Unterstützung bei der Gestaltung des Manuskriptes.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an Herrn Dr. H.D. Thames richten, für die freundliche Unterstützung bei der Datenanalyse.

Der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung GmbH, Neuherberg, insbesondere Prof. Dr. U. Hagen danke ich, mir die Benutzung der technischen Einrichtungen eines Großforschungszentrum für die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht zu haben.

Bei den Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung bedanke ich mich für kollegiale Unterstützung sowie liebevolle Betreuung der Tiere.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für zusätzliche Förderung gedankt.

Meinen Eltern

Ingeborg und Winfried

1. EINLEITUNG
2. MATERIAL UND METHODEN
 - 2.1 Versuchstiere
 - 2.2 Strahlenquelle
 - 2.3 Versuchsaufbau
 - 2.3.1 Positionierung der Tiere im Bestrahlungsfeld
 - 2.3.2 Beschreibung der Platte
 - 2.4 Versuchsdurchführung
 - 2.4.1 Narkose
 - 2.4.2 Lagerung der Tiere zur Bestrahlung
 - 2.4.3 Fertigung von Kontrollaufnahmen
 - 2.4.4 Bestrahlung der Tiere
 - 2.4.5 Vorgehen beim Setzen des Bohrlochdefektes
 - 2.4.5.1 Vorbereitung der Tiere
 - 2.4.5.2 Durchführung des Eingriffes
 - 2.4.5.3 Begründung der gewählten Lage des Bohrloches und seines Durchmessers
 - 2.4.6 Überwachung der Versuchsdurchführung
 - 2.4.7 Dosimetrie
 - 2.4.7.1 Orthovoltstrahlung und absorbierte Energiedosis in Knochengewebe
 - 2.4.7.2 Dosimetrische Überwachung der eingestrahlten Dosis
 - 2.4.7.3 Bestimmung des Proportionalitätsfaktors:
 - 2.4.7.3.1 mittels zweier Ionisationsdosimeter
 - 2.4.7.3.2 mittels Ionisationskammer und Festkörperdosimeter
 - 2.4.7.3.3 Übereinstimmung der Messergebnisse
 - 2.4.7.4 Anteil der Streustrahlung im kollateralen Bein
 - 2.5 Histologische Aufbereitung des Materials
 - 2.5.1 Entnahme, Fixierung und Entkalkung der Knochen
 - 2.5.2 Einbettung der Knochenstücke
 - 2.5.3 Anfertigung serieller Schnitte

- 2.5.4 Färbung der Schnitte
 - 2.5.4.1 Entacrylieren der Acrylatschnitte
 - 2.5.4.2 Färbung von Schnitten unentkalkten Knochens
 - 2.5.4.2.1 Azanfärbung nach Haidenhein
 - 2.5.4.3 Färbung von Schnitten sowohl entkalkten wie auch unentkalkten Knochens
 - 2.5.4.3.1 Färbung mittels der "Periodic-acid-Schiffreaktion"
 - 2.5.4.3.2 Modifizierte Massonsche Trichromfärbung nach Goldner
 - 2.5.4.4 Färbung von Schnitten entkalkten Knochens
 - 2.5.4.4.1 Modifizierte HE-Färbung nach Mayer
 - 2.5.4.4.2 HE-Färbung nach Delafield
- 2.6 Fertigung photomikroskopischer Aufnahmen
- 2.7 Morphometrie
- 3. ERGEBNISSE
 - 3.1 Beobachtung der Tiere
 - 3.1.1 Allgemeinbefinden der Tiere
 - 3.1.2 Gewichtskontrollen
 - 3.1.3 Beobachtete Hautveränderungen im Bestrahlungsfeld
 - 3.1.4 Beobachtungen während des chirurgischen Eingriffes
 - 3.2 Die Defektheilung eines umschriebenen Bohrlochdefektes im unbestrahlten Oberschenkelknochen der Wistarratte
 - 3.2.1 Verlauf der frühen Phase der Defektheilung
 - 3.2.2 Die Phase des kompakten Verschlusses des Bohrlochdefektes
 - 3.3 Der Einfluß verschieden hoher Einzeitdosen einer 320 kV Röntgenstrahlung auf die Knochenheilung
 - 3.3.1 Pathophysiologie der strahleninduzierten Störung früher Reparaturprozesse
 - 3.3.2 Quantifizierung des zeitlichen Verlaufes der Defektheilung in Abhängigkeit der Dosis nach Vorbestrahlung
 - 3.3.3 Dosisabhängige Strahlenwirkung auf die Defektheilung nach Einzeitbestrahlung

3.4 Der Einfluß der Zeit zwischen Bestrahlung und chirurgischem Eingriff auf die Defektheilung in Abhängigkeit der Dosis

3.5 Der Einfluß fraktionierter Strahlendosen auf die Knochenheilung im Rattenknochen

4. DISKUSSION

4.1 Methode

4.2 Defektheilung im Knochen

4.3 Strahleninduzierte Schädigung des intakten adulten Knochens

4.4 Pathohistologische und -physiologische Befunde als Folge einer strahleninduzierten Heilungsstörung im ausgewachsenen Knochen

4.5 Der Einfluß des Intervalls zwischen Bestrahlung und Trauma auf die Dosisabhängigkeit der Heilungsstörung

4.6 Der Effekt der Fraktionierung auf die strahleninduzierte Heilungsstörung im Knochen

4.7 Schlußfolgerung

5. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

6. LITERATURVERZEICHNIS



1.

EINLEITUNG

Bei nahezu jeder Strahlenbehandlung wird der Knochen nicht unerheblich hohen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt; so vor allem bei der Therapie von Mammakarzinomen, Kopf-Hals-Tumoren, Bektumtumoren und den primären und sekundären Geschwülsten der Knochen selber. Seit wenigen Jahren finden zudem niedrige therapeutische Dosen zur Verhinderung ektopischer Knochenbildung im Anschluß an einen künstlichen Hüftgelenkersatz klinische Anwendung (Anthony et al, 1987; Coventry and Scanlon, 1981)

Die Bestrahlung des wachsenden Knochens von Kindern und Jugendlichen mit Dosen über 20 Gy führt, in Abhängigkeit vom Alter des Patienten, zu einer dosisabhängigen Hemmung der Knochenentwicklung (Katzman et al, 1969; Riseborough et al, 1976; Rubin and Casarett, 1968 [a]). Die klinischen Folgen einer Strahlenschädigung der Wachstumsfugen der betroffenen Knochen sind u. a. gekennzeichnet durch Wirbelsäulenverkrümmung, Hypoplasie des Darmbeines bzw. des Brustkorbes und Verkrümmung und Verkürzung der langen Röhrenknochen der Extremitäten (Gössner et al, 1985; Rubin et al, 1962).

Im adulten Knochen dagegen entwickeln sich die Strahlenfolgen im allgemeinen langsam und manifestieren sich häufig erst nach Jahren als osteoporotische und/oder osteosklerotische Veränderungen, bzw. als aseptische Nekrose (Cooley and Goss, 1958; Gowgiel, 1960).

Als Folge der Osteoradionekrose des Oberschenkelknochens wurde, hauptsächlich im Anschluß an eine

heute nicht mehr durchgeführte Orthovoltbestrahlung gynäkologischer Tumoren, in bis zu 7.5 % der Patienten eine pathologische Fraktur meist im Oberschenkelhals diagnostiziert (Stephenson and Cohn, 1956). Rippenfrakturen wurden auch im Anschluß an eine Megavolttherapie von Mammatumoren in bis zu 19% der behandelten Patientinnen beobachtet (Overgaard et al, 1987). Ebenso, wie die soeben aufgezählten, zeigten auch pathologische Frakturen der Kieferknochen, welche in der Folge einer primär kurativen Strahlentherapie im Kopf- und Halsbereich in bis zu 24 % der Patienten entstanden (Morrish et al, 1981; Murray et al, 1980 [b]), nicht selten eine schlechte Heiltendenz. Nach Morrish et al (1981) trat in 68% der Osteoradionekrosepatienten keine Heilung ein; in den übrigen betrug die Heildauer bis zu 24 Monate.

Die beobachteten Strahlenschäden werden als Folge einer direkten Schädigung der Knochenzellen (Grimm, 1969; Gowgiel, 1960; Überschar, 1959), aber auch als avaskuläre Nekrose in Folge einer Schädigung der Mikrozirkulation (King et al, 1983; Rubin and Casarett, 1968 [b]) angesehen. Moss et al (1979) vertreten die plausible Ansicht, daß beide Prozesse in der Pathogenese der Strahlenschädigung im Knochen zusammenwirken.

Die moderne Behandlung bösartiger Geschwülste im Kopf-Halsbereich sowie von Sarkomen stellt sich heute als eine multidisziplinäre Aufgabe dar, bei der chirurgische Exzision entarteten Gewebes und Strahlentherapie der zurückgebliebenen Tumorreste miteinander kombiniert werden. Die konventionelle Bestrahlung mit 50 bis 60 Gy in 25 bis 30 Fraktionen über 5 bis 6 Wochen führt zu einer Inaktivierung von über 99.9% der Tumorzellen (Suit, 1973). Die Vorteile einer Vorbestrahlung werden

darin gesehen, daß die Wahrscheinlichkeit für eine Aussaat von vitalen Tumorzellen im Operationsgebiet bzw. in die Blutbahn relativ geringer ist. Zudem ist der Tumor geschrumpft und erscheint häufig gut abgekapselt, so daß die Operationswunde kleiner gehalten werden kann.

Die klinischen Erfahrungen sowie eine Reihe von experimentellen Studien haben jedoch gezeigt, daß ein chirurgischer Eingriff in vorbestrahltem Gebiet wesentlich häufiger als in unbestrahltem Gewebe zu Komplikationen führt (Ketcham et al, 1969; Mantravadi et al, 1981). So findet sich nach Vorbestrahlung eine gestörte Heilung von Haut- und abdominalen Wunden (Gorodetsky et al, 1987; Lawrence et al, 1953) sowie von intestinalen Anastomosen (Morgenstern et al, 1984; Ormiston, 1985; Wellwood et al, 1974) und eine verzögerte und verminderte knöcherne Konsolidierung von Knochenbrüchen (Shamberger, 1986; Suit et al, 1982).

Strahlenbiologische Untersuchungen sollten die wissenschaftlichen Grundlagen geben, auf Grund derer die optimale Therapie unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der Komplikationsrate von der Dosis und Sequenz und Intervall geplant werden kann. Es erscheint in der Strahlenbiologie häufig schwierig, Kriterien zu definieren, welche eine sinnvolle Abschätzung von Dosiswirkungen zulassen, sowie dosismodifizierende Effekte einer Messung zugänglich machen. Für eine Reihe von Geweben wurden zelluläre Kriterien entwickelt; so wurden zum Beispiel im Dünndarm der Maus anhand der Zahl überlebender Krypten Dosiswirkungsbeziehungen erarbeitet (Withers and Elkind, 1970). Für andere Gewebe wiederum wurden funktionelle Kriterien erarbeitet: so wurde die Paralyse der

Nachhand in Mäusen und Ratten zur Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung einer Rückenmarksbestrahlung verwendet (Van der Kogel, 1977).

Zur Untersuchung der dosiseffektiven Strahlenwirkung auf die Wundheilung bediente sich eine Reihe von Untersuchern der Störung in der Zunahme der Wundfestigkeit im Verlauf der Heilung von Haut- bzw. abdominalen Wunden (Gorodetsky et al, 1987). In einigen neueren Studien wurden verschiedene Modelle vorgestellt, welche die Unterdrückung der Defektheilung im langen Röhrenknochen von Kaninchen bzw. kleinen Nagern einer quantalisierbaren Messung zugänglich machten.

Wir haben das von Schlegel et al (1972) im langen Röhrenknochen des Beaglehundes entwickelte Bohrlochmodell in der Ratte etabliert und weiterentwickelt. Das Modell erlaubt sowohl eine qualitative wie auch eine quantitative Beurteilung der Strahlenwirkung auf die Defektheilung im Oberschenkelknochen der Ratte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an weiblichen Wistarratten (Wis/Nhg) im Alter von 14-18 Wochen und einem mittleren Gewicht von 220 Gramm durchgeführt. In 2 Serien betrug das Alter der Tiere 9 Monate (mittleres Gewicht: 300g). Die Tiere wurden in 43 cm x 26 cm großen Käfigen zu zweit bzw. in 60 cm x 38 cm großen zu viert gehalten. Pro Tier standen etwa 500 cm² Lauffläche zur Verfügung. Als Einstreu diente eine 2-3 cm dicke Lage aus Sägespänen (Labortier-Einstreu Lignocell, Typ 314; Fa. J. Rettenmaier und Söhne). Die Tiere erhielten ein pelletiertes Standardtrockenfutter (Standarddiät 13/24 für Ratten und Mäuse; Fa. Altromin) und Wasser ad libitum. Ein automatisches Lichtprogramm unterteilte den Tag in 12 Stunden Lichtphase und 12 Stunden Dunkelphase.

2.2 Strahlenquelle

Als Strahlenquelle diente eine Isovolt 420D-Röntgenröhre der Firma Seifert. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Röhrenspannung von 320 kV und einem Kathodenstrom von 12 mA. Das Gerät war mit einem Eigenfilter ausgerüstet, der 9 mm Beryllium entsprach. Zur Bestrahlung wurde zusätzlich ein Filter aus 0.9 mm Cu und 1.0 mm Al in den Strahlengang eingebracht. Mit Hilfe eines Kollimationstubus, 30 mm im Durchmesser, wurde das Strahlenfeld, bei einem Fokus-Hautabstand von 23,0 cm, auf einen Durchmesser von etwa 32 mm reduziert. Die frei Luft gemessene Dosisleistung betrug 4.5 Gy pro Minute, bei einer Halbwertschichtdicke von 2.7 mm Cu.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Positionierung der Tiere im Bestrahlungsfeld

Während der Pilotexperimente war deutlich geworden, daß eine besondere Haltevorrichtung nötig war, die eine stabile und leicht reproduzierbare Lagerung der Tiere während der Bestrahlung garantieren würde. Zudem sollte eine wiederholbare Ausrichtung des Strahlenfeldes exakt über dem Oberschenkelknochen gewährleistet sein.

2.3.2 Beschreibung der Platte

Die Vorrichtung wurde aus 10 mm dickem Plexiglas gefertigt (Abb. 01). Sie bestand aus einer, auf vier 10 mm hohen Füßen stehenden, 300 x 220 mm

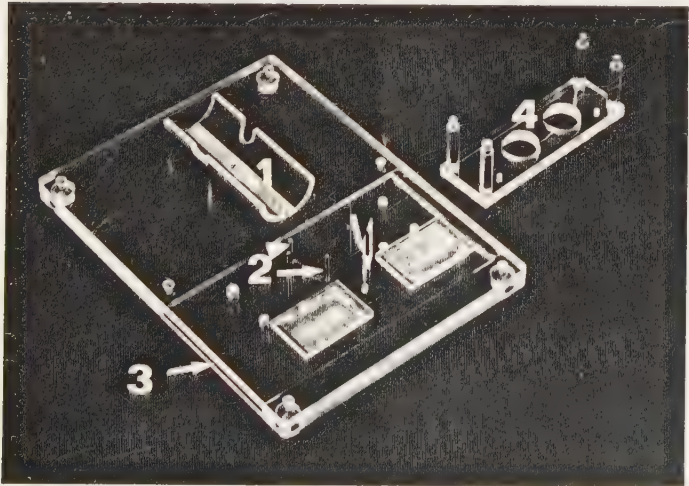


Abb. 01: Haltevorrichtung zur Bestrahlung der Tiere: Halbschale zur Aufnahme des Tieres (1); Stahlstifte (2); Filmlade (3); Brückenstein (4).

großen Bodenplatte und einer Halbschale zur Aufnahme von Kopf und Rumpf der Tiere. In der hinteren Hälfte des Plattenbodens war eine seitliche Aussparung in Form einer 120 mm x 210 mm großen Lade belassen, die der Aufnahme eines Röntgenfilmes diente. Die 120 mm lange, an beiden Enden offene Halbschale, mit einer lichten Weite von 42 mm, war in der Mitte der oberen Hälfte in Längsrichtung der Platte befestigt. In dieser konnte ihre Position um 20 mm verstellt werden, was die Positionierung von Ratten unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit von Wuchs und Alter ermöglichte. Eine seitliche Ausfräsung je links und rechts, im Übergang vom vorderen zum mittleren Drittel, diente als Durchlass für die Vorderextremitäten des Tieres. Hinter dieser Schale waren links und rechts der Mittellinie je drei Stahlstifte in die Platte gelassen. Sie bildeten jeweils ein ungleichseitiges Dreieck, dessen Eckpunkte auf einem Kreis mit einem Durchmesser von 32 mm lagen. In diesen beiden Feldern kamen die Oberschenkel der Tiere, durch die Stifte in ihrer Lage gehalten, zu liegen.

Zur reproduzierbaren Ausrichtung des Strahlenkegels über dem Oberschenkelknochen wurde eine Plexiglasbrücke konstruiert (Abb. 01). Sie setzte sich zusammen aus einem 150 mm x 150 mm großen Steg, der auf vier 30 mm hohen Füßen montiert war. In ersterem waren zwei kreisförmige 30 mm im Durchmesser große Aussparungen gefräst. Die Brücke wurde auf die Bodenplatte gesteckt. Sie war derart ausgerichtet, daß ihre beiden Aussparungen exakt über den in der Bodenplatte durch die Stifte begrenzten Feldern zu liegen kamen, um 40 mm senkrecht versetzt. Ihr Durchmesser entsprach dem Innendurchmesser des Strahlentubus. Seine genaue Ausrichtung, direkt über den kreis-

förmigen Aussparungen im Steg, machte die exakte Positionierung des Strahlenfeldes über dem Oberschenkelknochen leicht reproduzierbar (Abb. 02). Damit waren gleichzeitig gleichbleibende geometrische Bedingungen gewährleistet. Durch 3 mm dicke Bleiplatten, welche von unten her an den Brückensteg geschraubt wurden, wurde etwas mehr als das kraniale Drittel des Strahlenkegels zusätzlich ausgeblendet.

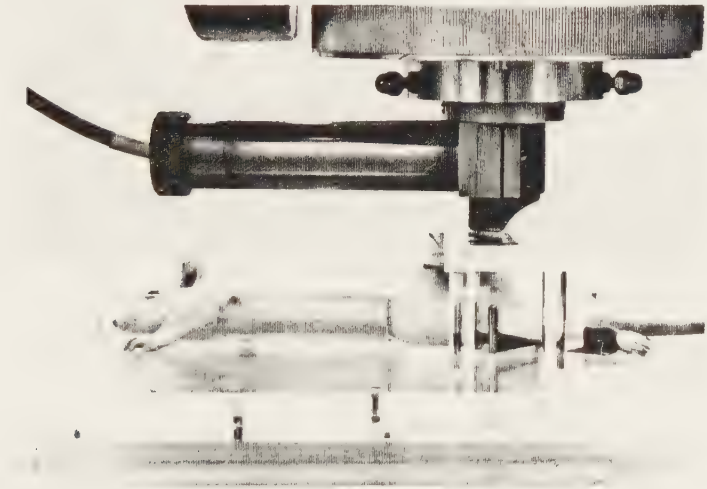


Abb. 02 : Ausrichtung des Strahlentubus über dem linken Oberschenkelknochen einer Ratte mittels der im Brückensteg vorgesehenen Aussparung.

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Narkose

Zur Durchführung der Versuche wurden die Ratten in Allgemeinnarkose versetzt. Dazu wurden ihnen

während eines kurzen Ätherrausches 70mg/kg KGW Ketaminbase (Ketavet^(R), Fa. Parke Davis) und 6mg/kg KGW Diazepam (Diazepam^(R), Fa. Ratiopharm) in der Mischspritze intraperitoneal appliziert. Über ein 1 bis 2 Minuten andauerndes Exzitationsstadium erreichten die Tiere nach 3-5 Minuten das Toleranzstadium. Dieses hielt eine gute halbe Stunde an. Die Atmung erschien verlangsamt, die Atemzüge waren vertieft. Analgesie und Muskelrelaxation waren gut.

Nach etwa einer Stunde begann die Aufwachphase, die unterschiedlich lange und bis zu einer Stunde andauern konnte. Die Narkose wurde von den Tieren gut vertragen. In Fraktionierungsexperimenten wurden über 5 Tage hinweg 24 Tiere täglich einmal und 24 Tiere täglich 2 mal in Narkose gelegt. In beiden Gruppen ging jeweils 1 Tier verloren, bedingt durch die Narkose. Davon verstarb nachweislich eines im Ätherrausch.

2.4.2

Lagerung der Tiere zur Bestrahlung

Kopf, Thorax und Abdomen des Tieres kamen in der PVC-Schale zu liegen (Abb. 03). Die Vorderextremitäten wurden durch die vorgesehenen Ausfräsungen seitlich nach außen geführt und mittels Klebstreifen auf der Bodenplatte fixiert. Die Hinterextremitäten ragten aus dem Ende der Schale heraus. Sie wurden seitlich abduziert, so daß der Oberschenkel zwischen den Metallstiften auf 8 mm hohen Querleisten zu liegen kam. Die Stifte dienten der Fixierung des Oberschenkels und verhinderten ein Ausweichen nach kranial bzw. kaudal. Ab dem Mittelfuß lag der Hinterfuß auf einer 8 mm hohen Platte und wurde dort mittels Klebstreifen fixiert. Der Oberschenkel kam waagerecht und in

einem stumpfen Winkel von etwa 100° zur Längsachse des Tieres abgespreizt zu liegen.

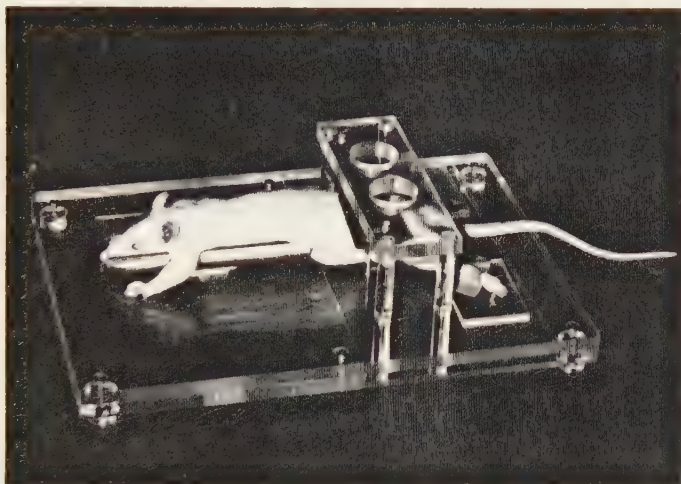


Abb. 03 : Zeigt ein in Bestrahlungsposition auf der Haltevorrichtung gelagertes Tier.

Nach Lagerung und Fixierung der Ratte auf der Haltevorrichtung wurde der Brückensteg über dem Oberschenkelknochen auf die Grundplatte gesteckt. Durch die Aussparungen hindurch wurde palpatorsch die Position der Oberschenkelknochen zum Bestrahlungsfeld kontrolliert und gegebenenfalls verbessert.

2.4.3

Fertigung von Kontrollaufnahmen

Zusätzlich wurden Röntgenkontrollaufnahmen gefertigt. Dazu wurde ein Film (Typ 52; Fa. Pola-

roid) in die vorgesehene Aussparung in der Bodenplatte gelegt. Der Tubus wurde über den genannten Aussparungen im Brückensteg ausgerichtet, und der Film bei 100 kV und 2 mA für 3 Sekunden belichtet. Mit Hilfe dieser Aufnahmen konnte die exakte Lage der Oberschenkelknochen im Zentrum des, durch den Tubus auf einen Durchmesser von 32 mm begrenzten, kreisrunden und im kranialen Abschnitt zusätzlich ausgeblendeten Strahlenfeldes abschließend überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden (Abb. 04).

2.4.4 Bestrahlung der Tiere

Anschließend wurden beide Oberschenkelknochen hintereinander und immer mit dem rechten beginnend, nach genauer Ausrichtung des Strahlentubus über der jeweiligen Aussparung im Brückensteg, bestrahlt.

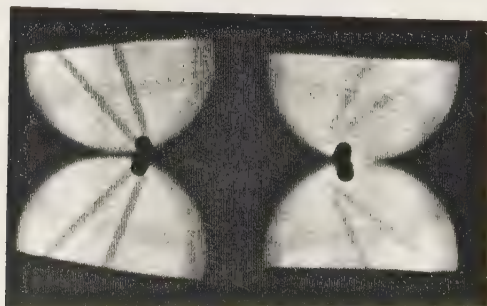


Abb. 04

Die Kontrollaufnahmen zeigen den Femur des linken und rechten Beines einer in Bestrahlungsposition liegenden Ratte vor und nach Bestrahlung. Er liegt vom caput femoris bis zu seinen Kondylen im Bestrahlungskegel des nach kranial hin ausgeblendeten Tubusfeldes. Die Femurdiaphyse wird somit vom Zentralstrahl des Strahlenkegels getroffen.

2.4.5 Vorgehen beim Setzen des Bohrlochdefektes

2.4.5.1 Vorbereitung der Tiere

Am narkotisierten Tier wurde ein seitliches Hautfeld freigeschoren. Dieses erstreckte sich, hinter dem Rippenbogen beginnend, nach kaudal über den Rumpf des Tieres, das gesamte Feld zwischen Wirbelsäule und linea alba umfassend, und setzte sich über Kruppe und Hinterbacke fort bis wenig distal des Kniegelenkes.

Das Tier wurde in Seitenlage auf einer PVC-Platte an Vorder- und Hinterpfoten mittels Klebstreifen fixiert. Die unten liegende Hinterextremität kam in Längsachse des Tierkörpers gestreckt zu liegen. Die oben liegende wurde, ebenfalls in gestreckter Haltung zur Körperachse, in einem rechten Winkel nach ventral gehalten, unterlagert von einer Binde aus Zellstoff. Das freigeschorene Hautfeld wurde mit 70% Alkohol und dann mittels 1.5% Sagrotanlösung desinfiziert.

2.4.5.2 Durchführung des Eingriffes

Der Zugang zum Oberschenkelknochen erfolgte von lateral (Piermattei et al, 1975). In der Mitte einer gedachten Geraden zwischen Trochanter major und lateralem Epicondylus des os femoris wurde in Längsrichtung über dem Oberschenkelknochen ein etwa 2cm langer Hautschnitt gelegt. Subcutanes Fettgewebe und oberflächliche Faszie wurden im Verlauf dieses Schnittes durchtrennt. Der musculus tensor fasciae latae und musculus gluteus superficialis bilden in der Ratte eine Einheit (Hebel and Stromberg, 1976). Ihre Faszie bildet mit jener des caput vertebrale des m. biceps fe-

moris ein intermuskuläres Septum, in welchem die Muskelbäuche stumpf voneinander getrennt wurden. *Musculus gluteus superficialis*, sowie der *m. adductor magnus et brevis* inserieren entlang dem Trochanter tertius und distal davon, entlang des Femurschaftes (Greene, 1963; Hebel and Stromberg, 1976). Der *m. vastus lateralis* nimmt dort seinen Ursprung. Diese Muskelgruppen wurden weitgehend scharf im distalen Drittel des Trochanter tertius, bis etwa 1 cm distal davon entlang des Femurschaftes mobilisiert. Die Muskelbäuche von *gluteus superficialis* und *vastus lateralis* wurden nach kranial, jene von *biceps femoris* und *adductor magnus et brevis* nach kaudal gespreizt gehalten. Der laterale Aspekt des Femurschaftes lag somit frei. Eine Hilfskraft fixierte diesen mittels zwei gebogener Gewebefazangen auf Höhe des dritten Trochanters und proximal der Epikondylen.

In Diaphysenmitte, wenige Millimeter distal des Trochanter tertius, wurde ein Bohrlochdefekt in die laterale Kortikalis des Oberschenkelknochens gesetzt, bis zur Eröffnung der Markhöhle. Die verwendeten Spiralbohrer aus Hartmetall (203/104-012; Fa. Meisinger), mit einem Durchmesser von 1.2 mm, wurden von einer Handbohrmaschine (Uni-drive N, Fa. Knürr AG) mit stufenlosem Geschwindigkeitsregler betrieben. Um eine Traumatisierung des, an den Bohrlochzylinder angrenzenden, knöchernen Gewebes durch Hitzeentwicklung möglichst gering zu halten, wurde bei niedriger Umdrehungsgeschwindigkeit gebohrt. Zusätzlich tropfenweise zugeführte physiologische Kochsalzlösung führte die entstehende Wärme ab. Die aus dem Markraum stammende Blutung wurde mittels Druck mit einem Mulltupfer zum Stehen gebracht.

Der Verschluß der Wunde begann mit einer fortlau-

fenden Muskelnahrt nach Reverdin zur Vereinigung der kranialen und kaudalen Muskelgruppen, sowie der tiefen Faszie. Hierzu wurde Plain Catgut Metric 5/0 verwendet. Der Hautschnitt wurde mit einfachen Knopfheften aus sterilem Zwirn der Stärke 3/0 verschlossen.

In jedem Tier wurde in einer Sitzung hintereinander an beiden Oberschenkelknochen der Eingriff vorgenommen. Das Arbeiten unter aseptischen Bedingungen machte die lokale Instillation oder systemische Versorgung der Tiere mit einem Chemotherapeutikum überflüssig.

2.4.5.3 Begründung der gewählten Lage des Bohrloches und seines Durchmessers

Der Trochanter tertius des Oberschenkelknochens der Ratte bildet laterodistal verlaufend eine prominente Muskelansatzleiste bis etwa zur Schaftmitte. Es erwies sich als günstig unmittelbar distal dieser Leiste das Bohrloch in die laterale Kortikalis zu setzen. Das foramen nutritivum liegt proximal davon, an der medialen Streckseite des Oberschenkelknochens (facies extensoria). Eine Schädigung dieses Gefäßes vor Eintritt in das Mark war somit praktisch ausgeschlossen.

Der Femurschaft 3-4 Monate alter Wistarratten ist auf der Höhe des auslaufenden dritten Trochanter im Querschnitt ovoid. An bis zu dreißig etwa 5 Monate alten Tieren ergaben an entsprechender Stelle durchgeführte Messungen einen Wert von 3.58 mm bzw 1.77 mm für den kraniokaudalen Aus- bzw. Innendurchmesser (Tab. 01). Letzterer erwies sich limitierend für die Stärke des zu verwendenden Bohrers.

Tab. 01 : Außen- und Innendurchmesser des os femoris der 4 Monate alten Wistar ratte in Diaphysenmitte un-mittelbar distal des trochanter tertius

		arithmet. Mittel [mm]	Anzahl [n]	mittlerer Fehler des Mittelwertes
Außendurch- messer	lateromedial	2.69	30	0.02
	kraniokaudal	3.58	30	0.03
Innendurch- messer	lateromedial	1.35	6	0.02
	kraniokaudal	1.77	6	0.04

In Pilotstudien kamen Bohrer mit Durchmessern von 1.0 bis 2.0 mm zur Anwendung. Es zeigte sich, daß bei der Verwendung von solchen mit einem Durchmesser größer als 1.2 mm eine zusätzliche Traumatisierung der den Markraum umfassenden inneren Knochenmanschette seitlich und distal des Bohrlochzylinders nicht ausgeschlossen werden konnte. Die in dieser Arbeit beschriebenen und diskutierten Versuche wurden alle an Defekten mit einem Durchmesser von 1.2 mm durchgeführt.

2.4.6 Überwachung der Versuchsdurchführung

Für jedes Tier wurde unter einer Identifikationsnummer (Ohrmarkierung) ein eigenes Protokoll angelegt. Hierin waren folgende Daten festgehalten:

1. Alter und Gewicht der Tiere zu Beginn und am Ende des Versuches.
2. Dosierung der verwendeten Narkotika, jeweils getrennt für die verschiedenen Eingriffe (Bestrahlung, Setzen des Bohrlochdefektes).

3. Bezüglich der Bestrahlung der Tiere wurden die Dosis pro Fraktion, die der Dosis entsprechende und im Voreinstellzähler des Dosimetergrundgerätes eingegebene Sprungzahl, sowie Datum und Uhrzeit der Fraktionen aufgelistet. Stichpunktartig wurden zusätzlich die Bestrahlungszeiten mittels Stoppuhr gemessen, um etwaige Abweichungen - bedingt durch Kalibrierungsfehler der Dosimetrie-einrichtung oder Schwankungen der Röntgenröhre - festzustellen und gegebenenfalls korrigieren zu können. Diese waren jedoch vernachlässigbar gering und werden daher weiter nicht besprochen.

4. Den chirurgischen Eingriff betreffend, wurden das Auftreten etwaiger Komplikationen (Traumatisierung größerer Gefäße) und die Stärke der Blutung aus dem gesetzten Bohrlochdefekt heraus festgehalten.

5. Des weiteren wurden die makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Haut im bestrahlten Feld beschrieben (Erythem, trockene oder feuchte Desquamation, Nekrose).

6. Im abschließenden Sektionsprotokoll wurden Gewicht, Alter, sowie das Allgemeinbefinden der Tiere und etwaige klinische Symptome festgehalten.

7. Der Oberschenkelknochen wurde dem Tier in toto entnommen. Dabei wurde die Güte der Festigkeit der Hautschnittwunde grobsinnlich durch Spannen und Ausüben von Zugkraft beurteilt und festgehalten. Auch der Resorptionszustand der Catguthefte wurde vermerkt. Zuletzt wurden der makroskopisch ersichtliche Zustand der Defektheilung beschrieben und etwaig auftretende Blutungen festgehalten.

2.4.7 Dosimetrie

2.4.7.1 Orthovoltstrahlung und absorbierte Energiedosis in Knochengewebe

Bei Photonenenergien bis 200 KeV dominiert der photoelektrische Prozeß in der Energieübertragung. Dieser ist abhängig von der Dichte des Absorbers. Knochen besitzt eine relativ hohe Atommassenzahl und ist etwa 1.8 mal so dicht wie Weichteilgewebe. Die absorbierte Dosis in Knochensalzen ist somit bei Orthovoltbestrahlung größer als in Weichteilgeweben. Entsprechend erfahren die den Knochen auskleidenden Häute (Periost, Endost und Gefäßbindegewebe in Havers'schen Kanälen) und ihre mesenchymalen Zellelemente eine in Abhängigkeit von der Photonenenergie höhere Dosis durch sekundäre Elektronen. Diese Vorgänge werden zudem kompliziert durch die fortschreitende Abnahme der Photonenenergie mit zunehmender Tiefe, bedingt durch die Absorption im durchstrahlten Knochengewebe. Die Absorption pro Masseneinheit nimmt jedoch wiederum mit abnehmender Photonenenergie zu.

Da angenommen werden kann, daß die durch Bestrahlung kritisch geschädigten osteogenen Zellen Gewebelemente der die Knochen auskleidenden Gefäß- und Bindegewebszellen sind, sich zudem maßgeblich auch retikuläre Elemente im Mark an Reparaturmechanismen im Knochen beteiligen, ist es nicht möglich, eine exakte Angabe für die absorbierte Energiedosis in diesen kritischen Zielgeweben zu machen. Die Dosisangaben beziehen sich daher auf die Dosis im Weichteilgewebe, wie von Woodard schon 1957 empfohlen.

2.4.7.2 Dosimetrische Überwachung der eingestrahelten Dosis

Die Strahlendosis wurde mit einem elektronischen Dosimeter (Universaldosimeter, Firma PTW, Freiburg) gemessen, bestehend aus Grundgerät, Meßkopf und Ionisationskammer. Dabei befand sich im Tubus der Röntgenröhre die Ionisationskammer, deren Meßort vom Zentralstrahl getroffen wurde. Das Dosimetergrundgerät enthält einen Voreinstellzähler und ein Teildosisinstrument, dessen Zeiger in der Zeit zwischen zwei Sprüngen von 0 bis zum Skalenende wandert. Die Sprungzeiten wurden vor jeder Bestrahlung mit einem Standard, der Strontium 90 enthielt, kalibriert. Ein Sprung entsprach bei korrekter Kalibrierung 5 R ($1R = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$).

Die Ionisationskammer war in fester Position im Tubus zwischen Fokus und Objekt geschaltet. Nach den Gesetzen der Strahlung verhält sich die Dosis umgekehrt proportional zu dem Quadrat des Abstandes von der Quelle. Wegen der stets gleichbleibenden Abstandsverhältnisse ist somit die im Tubus gemessene Dosis direkt proportional zur Dosis im bestrahlten Gewebe. Die einer Strahlendosis entsprechende Sprungzahl, die bei der Bestrahlung vorher eingestellt werden muß, errechnet sich aus der gewünschten Dosis, dividiert durch 5 (ein Sprung entspricht 5 R) und multipliziert mit dem Proportionalitätsfaktor.

2.4.7.3 Bestimmung des Proportionalitätsfaktors:

2.4.7.3.1 mittels zweier Ionisationsdosimeter

Der Abstandsfaktor wurde mit zwei, jeweils an ein separates Grundgerät angeschlossenen Ionisations-

kammern bestimmt. Dabei befand sich - entsprechend der Situation unter Versuchsbedingungen - eine der beiden Kammern im Tubus der Röntgenröhre. Eine zweite Kammer wurde an den Ort im Strahlenfeld verbracht, an dem unter Versuchsbedingungen der Oberschenkelknochen positioniert wäre. Der Meßort der beiden Kammern wurde vom Zentralstrahl getroffen.

Während der simultanen Bestrahlung wurde von den beiden Geräten eine unterschiedliche Dosis gemessen. Diese entsprach der unterschiedlichen Entfernung der beiden Kammern vom Fokus der Röhre. Das Verhältnis aus dem Meßergebnis der im Tubus befindlichen Kammer, zu jenem der am Ort des zu bestrahlenden Objektes liegenden, ergab schließlich den Proportionalitätsfaktor. Die an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführten Messungen (Anzahl $n = 18$) ergaben einen Faktor von $1.9 (1.893 \pm 0.047)$ (Tab. 02).

2.4.7.3.2 mittels Ionisationskammer und Festkörperdosimeter

Zusätzlich wurden mittels Thermoluminiszenzdosimeter Messungen durchgeführt. Das Thermoluminiszenzverfahren beruht auf der Fähigkeit von Stoffen, wie Lithiumfluorid, einen Teil eingestrahlter Energie ionisierender Strahlung zu speichern und diese bei Erwärmung in Form von sichtbarem Licht abzugeben. Die thermische Behandlung erfolgt unter reproduzierbaren Bedingungen nach einem genau festgelegten Plan. Das Integral über die gesamte Lichtemission ist proportional der eingestrahlten Dosis und nimmt über den Testdosisbereich linear mit dieser zu; der Umrechnungsfaktor ist somit eine konstante Größe in diesem Prüfabschnitt.

Lithiumfluorid zeichnet sich durch eine gute Empfindlichkeit aus und ist zudem relativ unabhängig von der Energie der untersuchten Strahlung. Zur Kalibrierung der einzelnen Thermolumineszenzdetektoren wurden diese einer Reihe bekannter Dosen einer 300 kV Röntgenstrahlung ausgesetzt. Die Menge sichtbaren Lichtes, welche bei der Ausheizung freigesetzt wurde, wurde für jedes Dosimeter bestimmt und der spezifische Konversionsfaktor berechnet.

Ein zylindrisches Fluoreszenzdosimeter, mit einem Durchmesser von 0.8 mm und einer Länge von 6 mm, wurde in einen um etwa 2 mm längeren PVC-Schlauch (Innendurchmesser 0.9 mm) gesteckt und dieser an beiden Enden verschlossen. In tiefer Barbituratnarkose wurden einer Ratte, jeweils in Diaphysenmitte des linken und rechten Oberschenkelknochens, ein sowohl laterale wie auch mediale Kortikalis perforierendes und im Durchmesser 1.5 mm großes Bohrloch gesetzt. Der Schlauch wurde derart hindurch gesteckt, daß das Dosimeter quer im Knochen zu liegen kam und mit beiden Enden nur minimal lateral bzw. medial herausragte. Muskel und Hautnaht wurden durch Knopfhefte verschlossen. Das Tier wurde in Bestrahlungsposition auf der Haltevorrichtung gelagert und fixiert. Einer der beiden Oberschenkel wurde lokal der definierten Dosis von 200 R exponiert. Diese Dosis wurde wiederum mittels der im Tubus befindlichen Ionisationskammer über das angeschlossene Grundgerät gemessen. Der Quotient aus der Meßgröße der Ionisationskammer und des Luminiszenzdosimeters, welches in dem im Zentralstrahl befindlichen Bein steckte, ergab wiederum den Proportionalitätsfaktor. Dieser war in zwei zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Meßreihen (je sechs Einzelmessungen) bestimmt worden und betrug demnach den Wert 1.865 ± 0.057 (Tabelle 03).

Tab. 02 : Bestimmung des Proportionalitätsfaktors mittels zweier Ionisationskammern. Der aus 18 Messungen gemittelte Faktor war 1.893

Dosimeter I	Dosimeter II	Faktor
[R]	[R]	[f]
200	110	1.818
200	110	1.818
300	160	1.875
300	165	1.818
300	155	1.936
300	155	1.936
300	155	1.936
400	215	1.861
300	155	1.936
200	105	1.904
200	110	1.818
200	105	1.904
300	155	1.936
300	155	1.936
300	155	1.936
400	215	1.861
400	210	1.904
300	155	1.936

2.4.7.3.3 Übereinstimmung der Messergebnisse

Aus den mittels zweier Ionisationskammern einerseits und Ionisationskammer und Festkörperdosimeter andererseits gefundenen Werten für den Proportionalitätsfaktor wurde das arithmetische Mittel gebildet und diese miteinander nach Student verglichen. Die beiden Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0.1747$) und ergeben einen mittleren Faktor von 1.9.

Tab. 03 : Bestimmung des Proportionalitätsfaktors mittels Ionisationskammer und Thermoluminiszenzdosimeter. Der aus 12 Messungen gemittelte Faktor betrug 1.865 (1 SEM = 0.057)

Dosimeter I	Festkörper- dosimeter I	Faktor
[R]	[R]	[f]
<u>erste Messreihe</u>		
200	111.6	1.792
200	111.9	1.787
200	111.3	1.797
200	106.5	1.878
200	110.1	1.817
200	109.5	1.826
<u>zweite Messreihe</u>		
200	106.2	1.880
200	103.1	1.939
200	104.5	1.914
200	107.4	1.860
200	102.8	1.945

2.4.7.4 Anteil der Streustrahlung im kollateralen Bein

Die von dem im kollateralen Bein befindlichen Dosimeter gemessene Größe ergab ein Maß für die Belastung durch die Streustrahlung. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tabelle 04 aufgelistet (Anzahl der Messungen $n = 12$). Der durch Streustrahlung bedingte Dosisanteil im jeweiligen kollateralen Bein betrug weniger als 0.5% der im Zentralstrahl gemessenen Gesamtdosis.

Tab. 04 : Der durch Streustrahlung im jeweiligen kollateralen Bein bedingte Dosisanteil wurde mit Festkörperdosimeter in 12 Messungen bestimmt. Er beträgt weniger als 0.5 Prozent der eingestrahlenen Dosis.

Dosimeter I	Festkörperdosimeter II	Faktor
[R]	[R]	[f]
200	.930	.00465
200	.930	.00465
200	.880	.00440
200	.870	.00435
200	.900	.00450
200	.910	.00455
200	.940	.00470
200	.980	.00490
200	.913	.00457
200	.993	.00497
200	.953	.00477
200	.926	.00460

2.5 Histologische Aufbereitung des Materials

2.5.1 Entnahme, Fixierung und Entkalkung der Knochen

Im Anschluß an festgelegte Heilperioden wurden die Tiere schmerzlos mittels Äther euthanasiert. Beide Oberschenkelknochen wurden entnommen und - nach schonender Entfernung der Muskulatur - in Formolalkohol für mindestens 3 Tage fixiert. Nachfolgend wurde für zweimal 24 Stunden in 70% Alkohol ausgewaschen. Bei dieser Prozedur findet nur geringe Quellung des Bindegewebes statt.

Nach der histologischen Aufbereitung des unentkalkten Knochenmaterials der ersten beiden Versuchsreihen und dem Beginn der Auswertung zeigte

sich, daß es beim Schneiden zu Zerreißen und Aufsplitterungen am gesamten Knochen und - vor allem im Bohrlochbereich - zum Absplittern von Teilen neugebildeten Knochens kam. In allen weiteren Serien wurden die Knochen daher entkalkt verarbeitet.

Die Entkalkung der Knochenstücke erfolgte in den meisten Fällen nach Romeis (1968, Nr.1661), in einem Gemisch bestehend aus gleichen Teilen 70% Alkohol und konzentrierter Ameisensäure. Sie war im Allgemeinen nach einer Dauer von 2 Wochen abgeschlossen.

Die Entkalkung in Äthylendiamintetraessigsäure nach Romeis (1968, Nr.1666-1668) wurde bei einigen Serien durchgeführt. Dazu wurden die Knochenstücke, nach dem Auswaschen in 70% Äthanol, in einem Gazebeutel an einem Faden hängend, in eine 25% Lösung des Dinatriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure verbracht. Die entstehenden komplexen Calciumverbindungen sinken zum Boden des Gefäßes. Bei dieser extrem gewebeschonenden Entkalkung waren die Färbeergebnisse der histologischen Schnitte besser als nach der zuvor beschriebenen Methode. Der Nachteil lag darin, daß die Knochenstücke bis zu 10 Wochen in der EDTA - Lösung verbleiben mußten, damit eine vollständige Entkalkung erreicht werden konnte.

Nach abgeschlossener Entkalkung konnte ein den Defekt einschließendes etwa 20 mm langes Diaphysenstück mittels Rasierklinge aus dem Oberschenkelknochen herausgeschnitten werden. Vor dem Beginn der nun anschließenden Einbettung wurde abermals in 70% Alkohol ausgewaschen.

Reagenzien

Fixierlösung

Neutrales gepuffertes Formol nach Lillie

37% Formaldehyd	100.0 ml
aqua dest.	900.0 ml
Natriumdihydrogenphosphat	4.0 g
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	6.5 g
pH der Gesamtlösung	7.0

Entkalkungslösungen

1. Ameisensäurelösung

konzentrierte Ameisensäure und 70% Aethanol im Verhältnis 1:1;

2. EDTA-Lösung

Dinatriumäthylendiamintetraessigsäure	250.0 g
Aqua destillata	200.0 ml
40% Natronlauge	50.0 ml
Aqua destillata ad	800.0 ml
40% Natronlauge tropfenweise bis	pH = 7.4
Aqua destillata ad	1000.0 ml

2.5.2

Einbettung der Knochenstücke

Die Einbettung erfolgte ausschließlich in Methacrylat. Die beschrifteten Knochenstücke wurden in Gewebekapseln verbracht. Die nun folgende Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe bis zum 99% Alkohol erfolgte über 7 Stunden im Autotechnicon. Anschließend beließ man die Gewebeproben für 12 Stunden bei 20 °C unter ständigem Schütteln in 100% Alkohol. Bei gleicher Temperatur und ebenfalls unter ständigem Schütteln folgten nacheinander jeweils für 2-3 Stunden einmal ein Gemisch aus gleichen Teilen 100% Alkohol und Methacrylsäure-Methylester und zweimal reines Methacrylat. Dabei stand die Probenflasche in einem evakuierten Exsikkator. Anschließend verblieben die Proben für 12 Stunden im Einbettungsgemisch.

Die eigentliche Einbettung der Knochenstücke begann mit der Anpolymerisierung des Gemisches. Dazu wurde in der Probenflasche die Luft über dem Einbettungsgemisch gegen Stickstoff ausgetauscht. Anschließend wurde für 3-5 Stunden im Warmwasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert. Das Anpolymerisieren mußte ständig überwacht werden. Der optimale Viskositätsgrad entsprach etwa dem von Kondensmilch.

Die Knochenstücke wurden den Gewebekapseln entnommen und in vorbeschriftete Rollrand-Schnappdeckel-Gläser (Inhalt: 10 ml; Größe: 22 x 45 mm) verbracht. Ihr Boden war mit Methacrylat vorgegossen und ausgehärtet. Nach dem Aufgießen des Einbettungsgemisches wurden die Gläser mittels perforierten Lupolen-Schnapp-Deckel verschlossen. Zum Aushärten des Acrylatgemisches verblieben sie für weitere 24 Stunden bei 45 Grad Celsius im Wasserbad.

Reagenzien

Molekularsieb 3A Perlform (Merck Art. 5704)
Methacrylsäure-Methylester zur Synthese (Merck Art. 800590)
Phtalsäuredibutylester (Merck Art. 800919)
2,4-Dichlorbenzoylperoxid (Serva, Heidelberg)

Einbettungsgemisch

Methacrylsäure-Methylester	100.0 ml
Phtalsäuredibutylester	30.0 ml
Dichlorbenzoylperoxid	2.5 g

2.5.3

Anfertigung serieller Schnitte

Von den derart fixierten, entkalkten und in einen Methacrylatblock gegossenen Knochenstücken wurden

mittels eines Hartschnittmikrotoms (Modell K; Fa. Jung) und einem Messer (Typ HK3; Fa. Jung) histologische Schnitte gefertigt. Die Schnittebene verlief parallel zur Streckfläche des Knochenstückes in Richtung seiner Längsachse. Somit war der Bohrlochzylinder parallel zu seinem Durchmesser getroffen. Beginnend an der Oberfläche der Kortikalis wurden, in 50 Micrometer-Abständen, endostwärts zum Mark hin aufsteigend, serielle 5 Micrometer dicke Schnitte gelegt. Mit der Eröffnung des Markraumes war der Bohrlochzylinder in den genannten Abständen über seine gesamte Höhe quergeschnitten, im Durchschnitt auf sieben Ebenen.

In zwei Serien verlief die Schnittebene senkrecht zur Streckfläche der Knochenstücke. Bei dieser Schnittechnik wurden Bohrloch und Markraum gleichzeitig dargestellt, was die Beobachtung der frühen Phasen der Defektheilung, sowie Vorgänge der Remodellierung zu späteren Zeitpunkten begünstigte. Bezüglich der Quantifizierung des neugebildeten Knochens im Defektvolumen zeigte diese Technik keine Vorteile gegenüber der zuerst genannten.

Die Schnitte wurden im Warmwasserbad bei ca. 40 °C gestreckt und anschließend nach Schnittebene getrennt auf Objektträger aufgezogen. Die mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträger waren nach Tiernummer und Schnittebene vorbe-schriftet worden. Dabei wurde periostal beginnend in 50 Micrometer-Sprüngen zum Mark aufsteigend gerechnet. Nachdem die Objektträger mit den aufgezogenen Schnitten in eine, speziell zu diesem Zweck gefertigte, Pressvorrichtung eingespannt worden waren, kamen sie für mindestens 24 Stunden zum Trocknen in einen auf etwa 32 Grad Celsius

vorgeheizten Trockenschrank. Das Anpressen des Schnittes auf dem beschichteten Objektträger während des Trockenvorganges garantiert ein sicheres Haften und verhindert ein Abschwimmen im Laufe der Färbung.

Lösungen

Chromalaungelatine

- | | |
|--|------------|
| 1. Aqua dest. | 100.0 ml |
| Gelatine | 800.0 mg |
| Kalt quellen lassen | |
| 2. Chromalaun | 80.0 mg |
| lösen in aqua dest. | 2.0 ml |
| hinzufügen Phenol | eine Prise |
| 3. Lösungen 1. und 2. zusammengeben; abschließend filtrieren | |

2.5.4 Färbung der Schnitte

2.5.4.1 Entacrylieren der Arylatschnitte

Die getrockneten Präparate wurden nacheinanderfolgend jeweils für 5 Minuten in 3 Küvetten mit Methylglykolacetat und in 2 Küvetten mit 99% Alkohol verbracht. Anschließend verblieben sie für etwa 2 Stunden in frisch angesetzter Kardasewitsch-Lösung. Nach 10-minütigem Spülen in fließendem Brunnenwasser und für weitere 5 Minuten in aqua dest. begann der eigentliche Färbegang.

Reagenzien

Kardasewitsch-lösung

- | | |
|--------------|----------|
| Äthanol 80% | 180.0 ml |
| Ammoniak 25% | 20.0 ml |

2.5.4.2 Färbung von Schnitten unentkalkten Knochens

2.5.4.2.1 Azanfärbung nach Heidenhain

Die entacrylierten Schnitte wurden in aqua dest. gebracht und kamen anschließend für 60 Minuten in auf 60 Grad Celsius vorgewärmtes Azokarmin. Die abgekühlten Objektträger wurden einzeln im Becherglas mit aqua dest. gespült. In Anilinlösung wurde differenziert, bis die Kerne eine deutlich rote Farbe zeigten. Auswaschen des Anilins erfolgte in essigsauerm Alkohol für etwa 1/2 Minute. Nach dem Spülen in aqua dest. wurde das Bindegewebe in 5 prozentiger wässriger Phosphorwolframsäure gebeizt und entfärbt. Es folgte abermaliges Spülen in aqua dest. Als dann wurden die Schnitte für etwa drei Stunden in eine 1:3 verdünnte wässrige Azanlösung verbracht. Nach abschließendem Differenzieren in 96% Athanol für 10 Sekunden und kurzem Eintauchen in absoluten Alkohol wurden sie in Xylol verbracht und mit Balsam eingedeckelt.

Färbeergebnis

Kalkhaltiges Knochengewebe sowie kollagenes und retikuläres Bindegewebe stellt sich scharf blau dar, während sich Osteoid rot und Muskelgewebe rötlich bis orange darstellt. Während die Granulationen der Zellen sich unterschiedlich gelb, rot oder blau anfärben, erscheint Chromatin rot. Diese Färbetechnik zeichnet sich durch den guten Kontrast verkalkten Knochens gegenüber den übrigen Geweben aus und erwies sich für die Anfertigung der photomikroskopischen Aufnahmen als besonders geeignet.

Lösungen

Azokarminlösung

Azokarmin 'G	0.1 g
aufkochen in aqua dest.	100.0 ml
Eisessig	1.0 ml

Azanlösung

Anilinblau wasserlöslich	0.5 g
Orange G	2.0 g
Eisessig	8.0 ml
aufkochen in aqua dest.	100.0 ml

Essigsaurer Alkohol

Äthanol 96%	100.0 ml
Eisessig	1.0 ml

Anilinlösung

Äthanol 90%	100.0 ml
Anilinöl	0.1 ml

2.5.4.3 Färbung von Schnitten sowohl entkalkten wie auch unentkalkten Knochens

2.5.4.3.1 Färbung mittels der "Periodic-acid-Schiffreaktion"

Die entakrylierten Schnitte wurden in dest. Wasser verbracht und anschließend für 7 Minuten in eine 0.5% Perjodsäurelösung bei Zimmertemperatur eingestellt. Nach 5 minütigem Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte für 10 Minuten in fuchsinschwefelige Säure (Schiff - Reagenz) verbracht. Hintereinander wurde anschließend in 3 Portionen Sulfitwasser jeweils 2 Minuten ausgewaschen. Nach dem Spülen in Leitungswasser und aqua dest. für etwa fünf Minuten wurden die Kerne mit Hämalun für 2 Minuten gefärbt. Nach aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurde mit Balsam eingedeckelt.

Färbeergebnis

PAS - positive Substanzen sind rosa bis violett gefärbt, die Kerne dunkelblauviolett.

Lösungen

Schiff - Reagenz nach Lillie

Natriumpyrosulfat	1.9 g
lösen in Salzsäure (1 mol/l)	15.0 ml
Pararosalin	1.0 g
gut schütteln und über Nacht im Dunklen stehen lassen	
Aktivkohle hinzugeben	500.0 mg
gut schütteln und filtrieren	
Lsg. muß entfärbt und klar sein	
Aqua dest. ad	100.0 ml

Sulfitwasser

Salzsäure (1 mol/l)	10.0 ml
Aqua dest.	90.0 ml
Natriumpyrosulfat lösen	1 Messerspitze

2.5.4.3.2 Modifizierte Massonsche Trichromfärbung nach Goldner

Die entacrylierten Schnitte wurden nach dem Wässern zwecks Kernfärbung für 3 Minuten in Eisen-hämatoxylin verbracht. Anschließend wurde für 10 Minuten in fließendem Wasser ausgewaschen. Nach fünf minütigem Färben in Säurefuchsin-Ponceau Lösung wurde kurz in 1% Essigsäure abgespült und anschließend für fünfzehn Minuten in Phosphormolybdänsäure-Orange differenziert, bis das Bindegewebe vollständig entfärbt war. Nach Abspülen in 1% Essigsäure wurde für 5 Minuten mit Lichtgrün gegengefärbt und anschließend 5 Minuten lang in 1% Essigsäurelösung ausgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte hintereinander durch drei

Portionen absoluten Alkohols und dann durch Xylol geführt und mit Balsam eingedeckelt.

Färbeergebnis

Die Zellkerne stellen sich bei dieser Färbemethode bräunlich bis schwarz und das Zytoplasma ziegelrot dar. Erythrozyten und Muskulatur erscheinen orangegelb, während sich reifer Knochen und Bindegewebe grün und unreifer kalkarmer Knochen unterschiedlich grün bis rot darstellen.

Lösungen

Säurefuchsin - Ponceau

Ponceau de Xylidine	0.2 g
Säurefuchsin	0.1 g
aqua dest.	300.0 ml
Eisessig	0.6 ml

Phosphormolybdänsäure - Orange

Phosphorwolframsäure	3 - 5 g
aqua dest	100.0 ml
Orange - G	2.0 g

Lichtgrün - Lösung

Lichtgrün	0.1-0.2 g
aqua dest.	100.0 ml
Eisessig	0.2 ml

2.5.4.4

Färbung von Schnitten entkalkten Knochens

Es wurden folgende Färbemethoden im Hinblick auf ihre Kontrastgebung zwischen Knochen und dem übrigen Gewebe untersucht:

2.5.4.4.1 modifizierte HE-Färbung nach Mayer

Die entacrylierten Schnitte wurden mindestens 5 Minuten im fließenden Brunnenwasser ausgespült und anschließend für 5 Minuten in aqua dest. verbracht. Mindestens für 4 Stunden, meist jedoch über Nacht, wurden sie in 43°C warmem saurem Hämalaun nach Mayer belassen. Nach kurzem Eintauchen in 5% Kaliumaluminiumsulfat wurde für mindestens 10 Minuten gewässert. Die Gegenfärbung in Eosin dauerte 5-6 Minuten. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (1x80%, 2x96%, 2x99%) wurden die Schnitte in Xylol verbracht und wie üblich mit Balsam eingedeckelt.

Färbeergebnis

Durch die relativ lange Färbung im warmen sauren Hämalaun nach Mayer färben sich außer den Zellkernen auch die übrigen Teile des Präparates in graublauem Ton etwas stärker an. Kittlinien, die bei der schichtweisen Apposition neugebildeten Knochens auf vorhandenen Knochenlamellen entstehen, treten deutlich hervor. Im Gesamten gewinnt die Färbung an Kontrast, was sich unter anderem für die Verarbeitung der photomikroskopischen Aufnahmen als vorteilhaft erwies.

2.5.4.4.2 HE-Färbung nach Delafield

Auch die Verwendung von Delafieldschem Hämatoxylin führte zu ähnlich kontrastreichen Färbeergebnissen, wenn bei 43°C inkubiert wurde.

Lösungen

Saures Haemalaun nach Mayer

Hämatoxylin	1.0 g
Lösen in aqua dest.	1000.0 ml
Natrium-Jodat	0.2 g
Kaliumaluminiumsulfat	50.0 g
nach gutem Schütteln	
Chloralhydrat	50.0 g
Lösung färbt sich blauviolett	
Zitronensäure	1.0 g
Lösung färbt sich rotviolett	
Lösung filtrieren	

Delafieldsches Hämatoxylin

Hämatoxylin	4.0 g
Lösen in absol. Alkohol	25.0 ml
Ammoniakalaun	40.0 g
Lösen in aqua dest.	400.0 ml
Lösung 1. und 2. mischen	
3-4 Tage offen stehen lassen	
dann filtrieren und folgendes hinzufügen:	
Glyzerin	100.0 ml
Methylalkohol	100.0 ml
einige Tage stehen lassen, filtrieren	

Eosin

Eosin gelblich	10.0 g
Lösen in aqua dest.	1000.0 ml
vor Gebrauch auf 200ml 3 Tropfen Eisessig	

2.6

Fertigung photomikroskopischer Aufnahmen

Von den gefärbten Schnittserien eines jeden Bohrloches wurden an einem Photomikroskop der Fa. Carl Zeiss Aufnahmen im Durchlicht gefertigt. Dabei wurde im allgemeinen mit einem Objektiv der Maßstabszahl 4.0 und einer numerischen Apertur von 0.65 gearbeitet. Des weiteren kamen ein Vergrößerungswechsler (Optovar) der Maßstabszahl 1.25, sowie ein Weitwinkelokular (KPL 12.5 W) zur Anwendung. Die Vergrößerung bei Einblick in den Tubus multiplizierte sich somit auf einen Gesamt-

vergrößerungsmaßstab von 62.5. In der Aufnahme-
stellung des Reflexionssystems entspricht der
Bildausschnitt, der im binokularen Tubus gesehen
wird, demjenigen, der auf den Film kommt. Der Ab-
bildungsmaßstab auf dem Film berechnet sich aus
der Maßstabszahl des Objektivs, dem Optovarfaktor
und dem Projektiv-Faktor von 3.2 auf eine sech-
zehnfache Vergrößerung.

Es wurde stets mit einem Panchromatischen Fein-
kornfilm der Empfindlichkeit 16 DIN gearbeitet.
Bei vorgewählter Stromstärke von 5 A und Vorwahl
der Empfindlichkeit der Automatik auf Stufe 4 lag
die automatisch gesteuerte Belichtungszeit bei
etwa 1 Sekunde.

2.7

Morphometrie

Von den Negativen der photomikroskopischen Auf-
nahmen wurden Abzüge der Größe 18 cm x 24 cm ge-
fertigt. Der Abbildungsmaßstab vom Präparat zu
dem Abzug betrug im allgemeinen etwa 1 : 120.

An den Abzügen wurden die äußeren Konturen des
Bohrloches sowie die Umrissse des eingewachsenen
Knochens mittels eines Faserstiftes nachgezogen
(Abb. 05). Mit Hilfe eines halbautomatischen Ana-
lysegerätes (MOP; Fa. Kontron Electronics GmbH)
wurde an den Aufnahmen für jede Schnittebene ge-
trennt der Anteil im Bohrloch ermittelt, der knö-
chern (bzw. nicht knöchern) verschlossen war. Da-
zu wurden mittels eines mit dem Gerät verbundenen
Abtastgerätes (Cursor) die gezogenen Linien nach-
gefahren. Über ein integriertes Programm berech-
nete der Automat das Maß einer jeden abgetasteten
und abgeschlossenen Fläche. Der aus der Summe der
Einzelwerte für die verschiedenen Schnittebenen

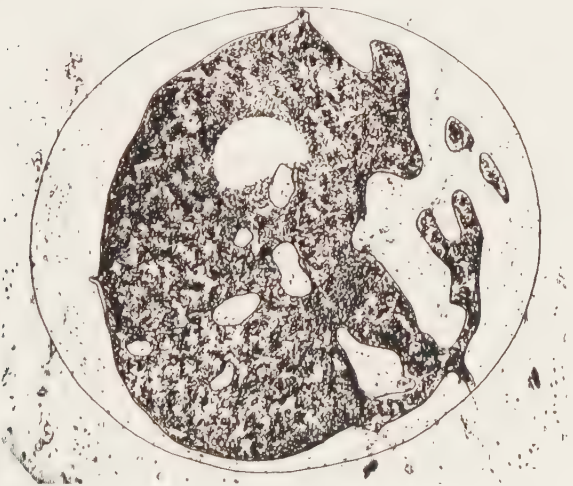
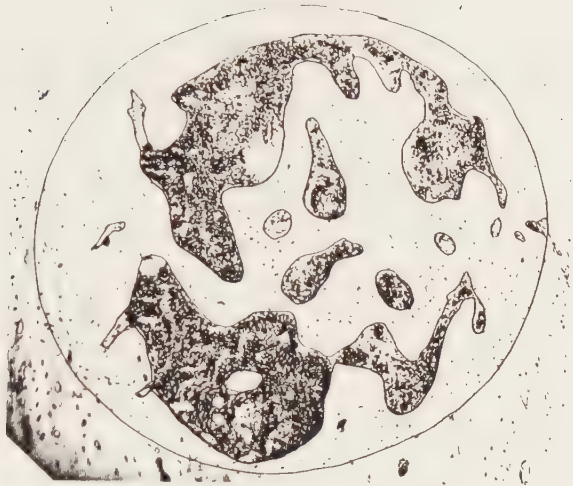


Abb. 05

Zwei Querschnitte in unterschiedlicher Tiefe durch ein Bohrloch im unbestrahlten kortikalen Knochen des Rattenfemur nach 5 wöchiger Heilungsdauer; die äußeren Konturen des Bohrloches und des zugebildeten Knochens sind mit Faserstift nachgefahren.

eines Bohrloches gemittelte Wert ergab ein Maß für den Volumenanteil im Bohrloch, der knöchern (bzw. nicht knöchern) verschlossen war.

Die in den verschiedenen Untersuchungen erbrachten Rohdaten geben für jedes einzelne Bohrloch den Anteil des Defektvolumens wieder, der knöchern (bzw. nicht knöchern) verschlossen ist. Neben der direkten Analyse dieser Daten wurden die Ergebnisse auch quantalisiert.

Bezogen auf einen definierten Anteil knöchern (bzw. nicht knöchern) verschlossenen Volumens ließen sich die für jedes einzelne Bohrloch gemittelten Werte in solche einteilen, die diesem mindestens entsprachen, und solche, die darunter lagen. Somit ließ sich für jede Dosisgruppe eines Versuches der Anteil positiver Reagenten (z. Bsp. der Anteil aller Bohrlöcher einer Dosisgruppe in einem Versuch, die weniger als 50% knöchern verschlossen sind) bestimmen.

Zur Quantifizierung der Dosisabhängigkeit der Knochenheilungsstörung wurde die Häufigkeit von Probanden herangezogen, die ein vorgegebenes Heilungsniveau nicht erreichten. Die Berechnung der ED_{50} -Werte erfolgte mittels Probit-Prozedur von SAS (SAS, 1982). Der berechnete mittlere Fehler des Mittelwertes bezog sich auf einen Vertrauensbereich von 95%.

Anhand dieses Verfahrens wurde die Gesamtheit der in dieser Arbeit besprochenen Versuche für verschiedene Heilungsniveaus von weniger als 20% bis, in Zehnerschritten aufsteigend, zu weniger als 80% des Bohrlochvolumens knöchern verschlossen analysiert.

Der Vergleich isoeffektiver Beziehungen aus den verschiedenen Versuchen wurde immer für ein definiertes Effektniveau vorgenommen. Dies geschah im allgemeinen im mittleren Effektbereich zwischen 40% und 60%. Auch war die Dosiseffektbeziehung in diesem Bereich am besten definiert und somit die größte Genauigkeit garantiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Beobachtung der Tiere

3.1.1 Allgemeinbefinden der Tiere

Wie schon unter 2.4.1. erwähnt wurde die Narkose von den Tieren gut vertragen. Ebenso erholten sie sich schnell von dem chirurgischen Eingriff. Im allgemeinen belasteten sie die Hinterhand wenige Stunden danach weitgehend normal. In seltenen Fällen dauerte diese Erholungsphase bis zu 24 Stunden. Wie unter 2.1. beschrieben, wurden die Tiere in Käfige verbracht, in denen sie frei herumlaufen konnten.

Während der in wöchentlichen Abständen durchgeführten Begutachtung konnte an keiner der Ratten eine Beeinträchtigung hinsichtlich des Bewegungs- und Spieltriebes, sowie der Futteraufnahme beobachtet werden.

3.1.2 Gewichtskontrollen

Das Gewicht der Tiere wurde sowohl am Beginn eines Versuches, wie auch am Ende zum Zeitpunkt ihres Abtötens ermittelt und auf dem jeweiligen Protokoll festgehalten. Das mittlere Körpergewicht 12 Wochen alter Wistarratten unseres Stammes betrug 220 g. In der mittleren Heilperiode von 6.5 Wochen nahmen die Kontrolltiere im Durchschnitt um etwa 20 g an Gewicht zu. Wie aus Tabelle 05 hervorgeht, war die gemittelte Gewichtszunahme der Tiere aus den Einzeitdosisversuchen wie auch aus den Fraktionierungsversuchen über die gleiche Heilperiode gleich derjenigen der unbestrahlten Kontrolltiere und unterschied sich

nicht wesentlich von der in unbehandelten Tieren. Dies wurde als weiteres Indiz dafür gewertet, daß weder die lokale Strahlenexposition der Tiere noch der chirurgische Eingriff sich negativ auf das Wohl- und Allgemeinbefinden der Tiere auswirkten.

Tab. 05 : Gewicht der Ratten am Beginn (mittleres Alter 14 Wochen) und Ende (mittleres Alter 21 Wochen) eines Versuches in Abhängigkeit des Behandlungsschemas.

Dosis [Gy]	Anzahl Tiere [n]	Anfangs- gewicht [g]	End- gewicht [g]	Standard- abweichung [g]
<u>unbehandelt</u>				
--	26	221	238	10.0
<u>bestrahlt mit 1 F und OP</u>				
0	30	219		8.7
	6		235	9.3
10	34	229		11.2
	7		241	13.2
15	33	226		11.2
	6		240	5.2
19	32	226		10.2
	5		239	4.0
22	16	227		12.6
	3		238	13.6
<u>bestrahlt mit 3 F und OP</u>				
0	7	223		14.2
26	21		234	13.9
26	21		245	13.2
<u>bestrahlt mit 10 F und OP</u>				
0	30	226		8.7
34	7		247	8.4
45	8		242	8.4

3.1.3

Beobachtete Hautveränderungen im Bestrahlungsfeld

Während der wöchentlichen Kontrolle der Tiere wurden die makroskopisch sichtbaren Veränderungen der mitbestrahlten Haut über dem Oberschenkel begutachtet und festgehalten. Diese Aufzeichnungen hatten zum Zweck, gegebenenfalls einen möglichen Zusammenhang zwischen Veränderungen an den den Knochen abdeckenden Weichteilgeweben und einer Beeinträchtigung der Knochenheilung herstellen zu können. Der Umfang der Aufzeichnungen reichte jedoch nicht aus, eine exakte Beziehung zwischen der Strahlenwirkung in der Haut und der eingestrahlten Dosis herzustellen.

In den ersten ein bis zwei Wochen nach Bestrahlung konnte in allen Dosisgruppen ein kutanes Ödem beobachtet werden, vergesellschaftet mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten Erythem. Nach Einzeildosen von 15 Gy und darüber war das Hautfeld zunehmend leuchtend rot gefärbt. In der Folge wurde unterschiedlich stark ausgeprägte Schuppenbildung beobachtet. Diese trat in den hohen Dosisgruppen (19 bis 22 Gy) ab dem zehnten Tag, in den mittleren (15 bis 17 Gy) bzw. niedrigeren Dosisgruppen (unter 15 Gy) einige Tage später auf. Sie war nach einer Einzeildosis von 15 Gy nur gelegentlich und auf kleinste Areale in Wundrandnähe mit einer feuchten Reaktion vergesellschaftet, die spätestens bis Ende der fünften Woche abgeheilt war. Die Radiodermatitis exsudativa umfaßte mit zunehmender Dosis größere, über den Wundrandbereich reichende Hautfelder (Abb. 06). Sie war gekennzeichnet durch die Bildung kleiner Bläschen, deren Inhalt sich nach dem Abschilfern der Bläschendecke auf der Hautoberfläche entleerte und zu den charakteristischen gelblichen bis rot-braunen Krusten geronn (Abb. 07). In den

höchsten Dosisgruppen wurden gelegentlich auch ulzeröse Veränderungen gesehen, was auf eine Mitbeteiligung der Dermis schließen ließ. Sowohl die feuchten wie auch die nekrotischen Hautveränderungen heilten in allen Tieren im allgemeinen bis Ende der siebten Woche, in Abhängigkeit von der Stärke der Reaktion und somit von der Dosis unterschiedlich schnell ab. In den niedrigen und mittleren Dosisgruppen hingegen war die Heilung der Hautveränderungen meist schon Ende der fünften Woche abgeschlossen.

In den nekrotischen Hautarealen kam es nicht selten zu einer Verklebung und zu bindegewebigen Verwachsungen der subkutanen Bindegewebsschicht mit den Perimysia der darunterliegenden Muskelschichten. In keinem der Tiere konnte ein Übergreifen dieser Prozesse auf die tieferliegenden Muskelschichten bzw. auf den Knochen beobachtet werden. Ebenso zeigte keines der Tiere Symptome eines lokalen oder systemischen infektiösen Geschehens.

In den Tieren, welche fraktionierten Strahlendosen ausgesetzt worden waren, stimmten die strahlenbedingten Hautveränderungen mit den oben beschriebenen überein. Signifikante Unterschiede bezüglich der Stärke und des zeitlichen Verlaufes der Strahlenreaktion konnten in diesen beiden Versuchsgruppen nicht gefunden werden.

In den Versuchen, in denen der Eingriff zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung vorgenommen wurde, konnten hingegen wesentlich mildere Hautreaktionen beobachtet werden. So zeigten jene Tiere, welche vier Wochen nach Bestrahlung operiert wurden, zum Zeitpunkt des Eingriffes lediglich eine desquamative Radiodermatitis sicca bzw.



Abb. 06: Radiodermatitis desquamativa sicca et madidans am
12. postoperativen Tag in einem mit 16 Gy vorbe-
strahlten Hautfeld.



Abb. 07: Radiodermatitis exsudativa et necroticans 14 Tage
nach dem operativen Eingriff und Vorbestrahlung
mit 22 Gy.

eine sehr milde Radiodermatitis madidans als maximale Reaktion in der höchsten Dosisgruppe von 20 Gy.

3.1.4 Beobachtungen während des chirurgischen Eingriffes

In den Tieren, in denen der operative Eingriff 24 Stunden oder 3 oder 7 Tage nach fraktionierter- bzw. Einzeitbestrahlung durchgeführt wurde, fiel auf, daß in den hohen Dosisgruppen die aus dem Bohrloch stammende Blutung wesentlich heftiger war als in den Kontrollgruppen. In den niedrigen Dosisgruppen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren gefunden werden.

In den Tieren, an denen der Eingriff vier Wochen bzw. bis zu sechs Monate nach der Bestrahlung vorgenommen wurde, war hingegen die Hämorrhagie aus dem Bohrloch in den mittleren und besonders in den hohen Dosisgruppen wesentlich reduziert gegenüber der in den Kontrolltieren beobachteten.

3.1.5 Beobachtungen bei der Entnahme der Knochen

Bei der Entnahme der Knochen wurde auch die Wundfestigkeit geprüft. In den Kontrolltieren waren die Wundränder nach Ablauf von 3 Wochen im allgemeinen fest miteinander verbunden und konnten nach Entfernung der Hefte nur auf festen Zug voneinander getrennt werden. Die Wunden der mit Einzeitdosen von 15 Gy und mehr vorbestrahlten Tiere zeigten generell eine schlechte Haftung der dermalen und subkutanen Wundränder. Während nach 15 Gy ihre Verbindung offensichtlich langsamer als in den Kontrolltieren an Festigkeit zunahm, konnte jedoch 6-7 Wochen nach dem Eingriff meist kein Unterschied in der Wundfestigkeit bemerkt werden.

Nicht so in den hohen Dosisgruppen von 19 und 22 Gy. Hier genügte häufig schon ein mäßiger Zug um die Wundränder zumindest teilweise entlang der ehemaligen Schnittstelle voneinander zu trennen. An Stelle einer festen Verbindung erschienen sie lediglich unterschiedlich lose miteinander verklebt. Dennoch wurden nur ganz selten ein spontanes Aufreißen, und in keinem Fall ein Aufreißen der gesamten Hautnaht gefunden (maximal ein Drittel derselben); die Heilung erfolgte anschließend per secundam.

In keinem der Tiere kam es zum Aufreißen der Muskelnaht. Es fiel jedoch auf, daß in den hohen Dosisgruppen das Nahtmaterial aus Plain-Catgut selbst 7 Wochen nach der Operation weitgehend unresorbiert geblieben war.

Auch in den Tieren, in welchen der Oberschenkel mit fraktionierten Strahlendosen vorbestrahlt worden war, zeigte sich die Wundfestigkeit wiederum in den hohen Gesamtdosisgruppen deutlich reduziert gegenüber der Kontrolle in der 6. und 7. Woche.

3.2 Die Defektheilung eines umschriebenen Bohrlochdefektes im unbestrahlten Oberschenkelknochen der Wistarratte

3.2.1 Verlauf der frühen Phase der Defektheilung

Der Verlauf der frühen Phase der Defektheilung wurde an einer Gruppe von 16 scheinbestrahlten Tieren verfolgt. Jeweils 2 Tiere wurden am ersten, dritten und vierten sowie am siebten, zehnten und elften; vierzehnten und fünfzehnten und am einundzwanzigsten Tag zufällig aus der Gruppe herausgegriffen und abgetötet. Die entnommenen

Knochen wurden, wie unter 2.5. beschrieben, histologisch aufbereitet. Die Schnittebene verlief parallel zur Höhe des Bohrlochdefektes und zur Längsachse des Knochens, was die gleichzeitige Beobachtung der Vorgänge im Mark und im Defektzylinder, sowie entlang der endostalen und periostalen Knochenflächen erlaubte.

In der Folge der Traumatisierung von Havers'schen und periostalen Gefäßen, sowie solchen im Markraum, kommt es nach Setzen des Bohrlochdefektes zur Bildung eines Hämatoms im Defekt der Knochenmanschette und unmittelbar daran angrenzend im Mark. Die folgende entzündliche Reaktion ist gekennzeichnet durch fibrinöse Exsudation und das Einwandern polymorphkerniger Leukozyten und Makrophagen.

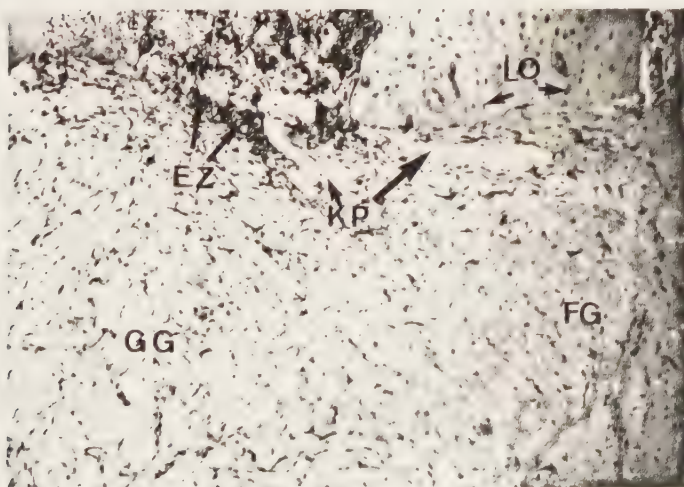


Abb. 08:

Tag 3 nach Setzen des Bohrlochdefektes im unbestrahlten Rattenfemur: Das Fibringerinnsel (FG) wird durch Granulationsgewebe (GG), welches vom Mark her einsprosst, zunehmend organisiert: Kapillare (KP), Makrophage (MP), Entzündungszellen (EZ), leere Osteozytenlakunen (LO).

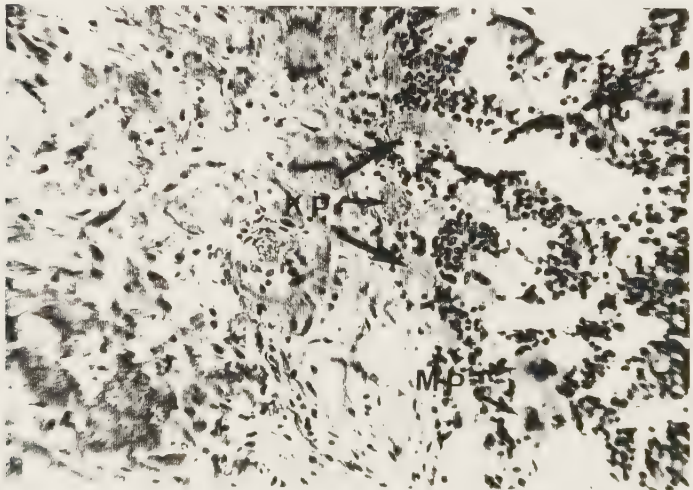
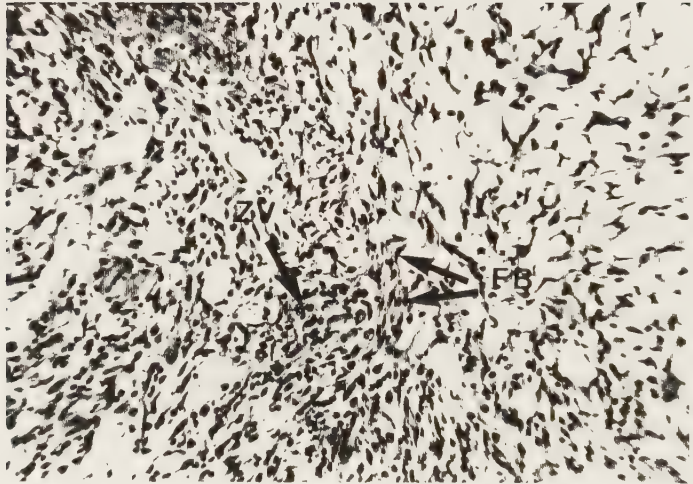


Abb. 09: Tag 3 nach Setzen des Defektes: die Granulationsgewebsbildung ist charakterisiert durch Zellverdichtung (ZV), durch das Aufkommen fibroblastenähnlicher Zellen (FB) und das Einsprossen von Kapillaren (KP); Makrophage (MP); Abb. oben HE-Färbung, Abb. unten Goldner-Färbung.

Am 3. Tag sind große Teile des Fibringerinnsels im Mark sowie im Randbereich des Bohrloches abgeräumt (Abb. 08). Nur mehr vereinzelt können hier eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten bzw. Makrophagen gefunden werden. Die Vielzahl einsprossender Gefäße bestehen meist nur aus einer mit Endothelzellen ausgekleideten Basalmembran (Abb. 09 [a]). Ihrem Verlauf folgen Bindegewebszellen, deren relativ plumpe Formen und ovoide Kerne auf Fibroblasten schließen lassen. Meist sind diese Zellen locker zwischen den Gefäßen verteilt. Streckenweise bilden sie dichtere Züge, in denen die randständigen Zellen zumindest relativ gleichgerichtet verlaufen (Abb. 09 [b]). Größtenteils sind, vor allem im Zentrum dieser Zellverdichtung, die Zellen in eine amorphe, sich unterschiedlich bis stark azurophil verhaltende Substanz eingebettet. Fasern lassen sich lichtmikroskopisch nicht nachweisen. In unmittelbarer Nähe von Knochen zeigten manche Zellen das Erscheinungsbild von Osteoklasten.

Am 4. Tag läßt sich stellenweise ein spongiöses Gerüst unreifer Knochenbälkchen deutlich erkennen (Abb. 10). Die diesem aufliegenden Zellen bilden streckenweise ein für Osteoblasten charakteristisches Pseudoepithel mit seitlichem Zellkontakt untereinander. Häufig kennzeichnet ihr Zytoplasma ausgeprägte Basophilie, charakteristisch für den Osteoblasten. Diese wiederum fehlt den in die Grundsubstanz eingebetteten Zellen, deren unterschiedlich große Kerne polymorpher Gestalt gelegentlich Degenerationsformen erkennen lassen.

Im Zentrum des Defektzylinders und periostalwärts dominiert noch das Fibringerinnsel. Dieses wird im Laufe der folgenden Tage durch einsprossende

feinste Gefäße und deren Bindegewebszellen vollständig organisiert.

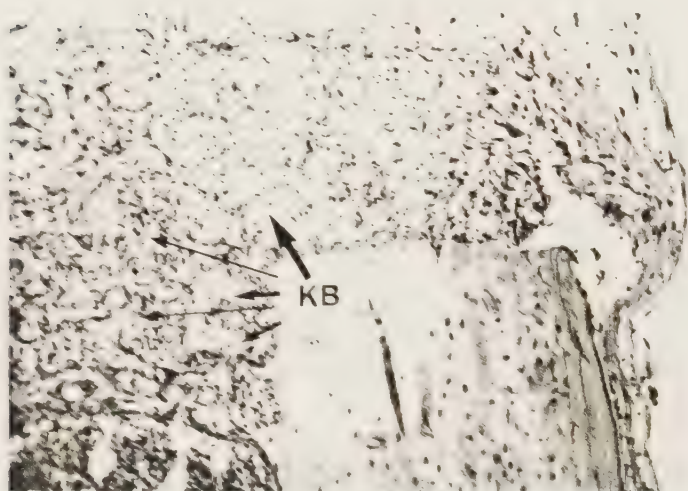


Abb. 10: Am 4. Tag nach dem operativen Eingriff werden im Bohrloch erstmals neugebildete Knochenbälkchen gesehen (KB); diese erscheinen zuerst in unmittelbarer Nähe von Knochenoberflächen; HE-Färbung.

Der innere Kallus wächst in den folgenden Tagen zunehmend in den Defektzylinder ein. Am fünften Tag verschließt er, als Gerüst ungeordnet miteinander anastomosierender plumper Bälkchen unreifen Knochens, markseitig den Bohrlochdefekt. Am siebten Tag füllt er den Defekt schwammartig aus. Zu einem geringen Grade ist nun auch das Periost an der Bildung neuen Knochens beteiligt.

Spätestens am 10. Tag ist der Defekt durch ein Geflecht spongiösen Knochens nach außen hin ver-

schlossen (Abb. 11). Die Räume zwischen den Trabekeln sind mit sinusoidalen Gefäßen, Bindegewebszellen und Markzellen ausgefüllt; die Trabekel selbst mit meist aktiven Osteoblasten tapeziert (Abb. 11). Durch fortschreitenden Umbau, d. h. durch Abbau unreifen Knochens und zunehmende Apposition lamellären Knochens (z. T. auch auf Trabekelüberresten), schließen sich die Zwischenräume allmählich, so daß reifer kompakter Knochen entsteht. Gleichzeitig findet auch auf der endostalen Seite Zubildung reifen Knochens statt.

Im Mark und im marknahen Teil des Bohrlochzylinders fällt auf, daß die Anzahl der primären Knochenbälkchen am 10. Tag gegenüber dem 7. Tag abgenommen hat. Auf den Trabekeln sind häufig aktive Osteoklasten zu finden, charakterisiert als vielkernige Riesenzellen in den typischen Lakunen (Abb. 11).

20 Tage nach Setzen des Defektes ist der Markraum frei von Trabekeln (Abb. 12). Ebenso sind in der marknahen Hälfte des Defektzylinders nur mehr vereinzelte, scheinbar frei liegende Trabekel zu finden. In seriellen Schnitten, parallel zum Durchmesser des Defektzylinders, kann nachgewiesen werden, daß die scheinbar freiliegenden Trabekel Kontakt mit den Flächen reifen lamellären Knochens in dem periostnahen Bohrlochabschnitt und entlang der Defektinnenwandung (Abb. 05).

Am 21. Tag sind im Mittel annähernd 50% des Defektvolumens durch kompakten Knochen verschlossen. In den folgenden Wochen wird durch fortschreitende endostale Apposition neuen Knochens der Defekt zunehmend kompakt verschlossen.

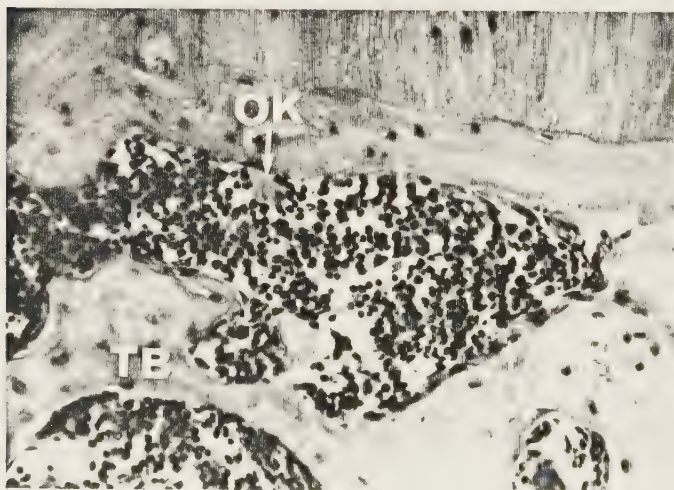
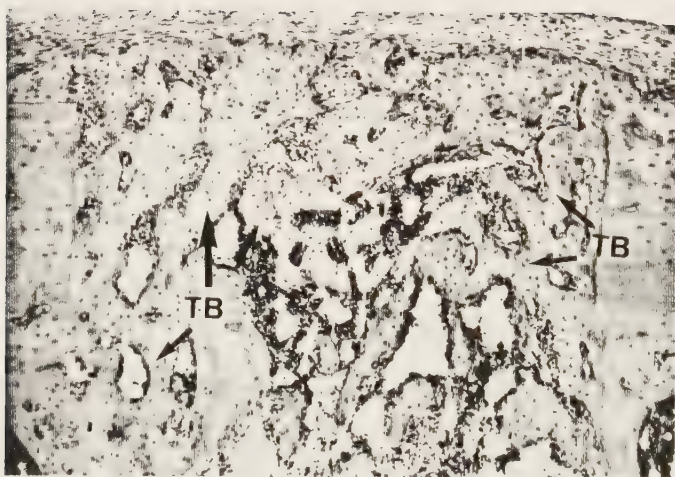


Abb. 11: Zehn Tage nach Setzen des Defektes: Primärer Knochenkallus füllt das Bohrloch weitgehend aus (obere Abb.); aktive Osteoblasten (OB) liegen den rel. plumpen Trabekeln (TB) als Pseudoepithelien auf, und in den Zwischenräumen sind sinusoidale Gefäße, Binde- und Markgewebe zu finden. Häufig werden jetzt auch aktive Osteoklasten (OK) in den typischen Howships'-schen Lakunen gesehen; HE-Färbung.

Das Periost ist am 3. und 4. Tag meist einseitig durch ein Hämatom von der Knochenoberfläche abgehoben (Abb. 13). Seine Faserschichten sind ödematös aufgelockert. Dazwischen liegen eine Vielzahl von kleinsten Gefäßen und vereinzeilt Entzündungszellen. Das Periost hat den Defekt am 4. Tag überbrückt (Abb. 13, Pfeil). Zwischen dem 4. und 7. Tag werden erstmals der Knochenmanschette aufliegende Knochenbälkchen gefunden, jedoch nur auf einer Seite des Defektes, zur Muskelansatzleiste des trochanter tertius hin. Auch wenn im Laufe der nächsten Tage weiterhin periostal neue Trabekel gebildet werden, so nehmen diese nur teilweise, oberflächlich und häufig ungleichmäßig, am Verschuß des Defektes teil (Abb. 12). Im Laufe der nächsten beiden Wochen werden sie größtenteils zu kompaktem Knochen umgebaut. Durch zu-

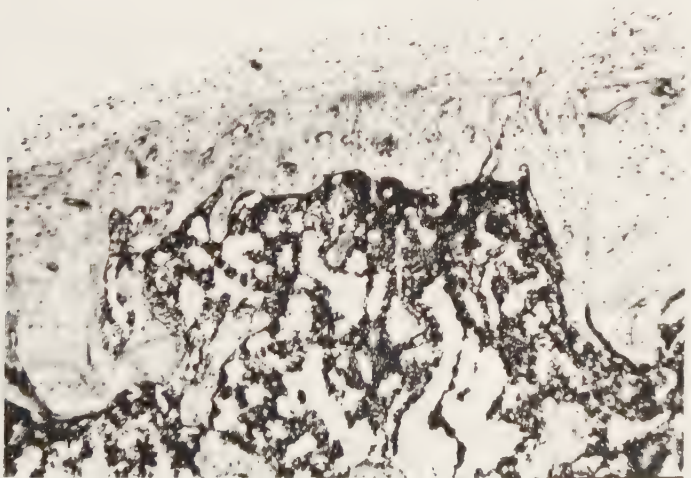


Abb. 12: 20 Tage nach dem Eingriff reift im unbestrahlten Knochen der spongiöse Kallus zunehmend aus: durch Abbau unreifer Trabekel (dominiert das Geschehen im Mark) und durch fortschreitende Apposition eines reifen lamellären Knochens; HE-Färbung.

nehmende osteoklastische Aktivität wird dieser Knochenüberschuß, der sich auf der Knochenmanschette gebildet hat, bis spätestens zur neunten Woche vollständig resorbiert.

Knorpelbildung konnte in keinem der untersuchten Präparate gefunden werden.

Die endostale Reaktion ist im allgemeinen relativ gering und bleibt auf den Randbereich des Bohrlochs begrenzt. Dennoch ist selbst 7 Wochen nach Setzen des Defektes ein leicht in das Mark vorspringender Wulst kompakten Knochens entlang des Defektrandes zu beobachten. Durch Proliferation und Zellmigration findet das Endost früh Anschluß an präformierte Trabekel im Mark und Bohrlochzylinder und beteiligt sich in der Folge durch Apposition neuen lamellären Knochens am kompakten Verschuß des Defektes.

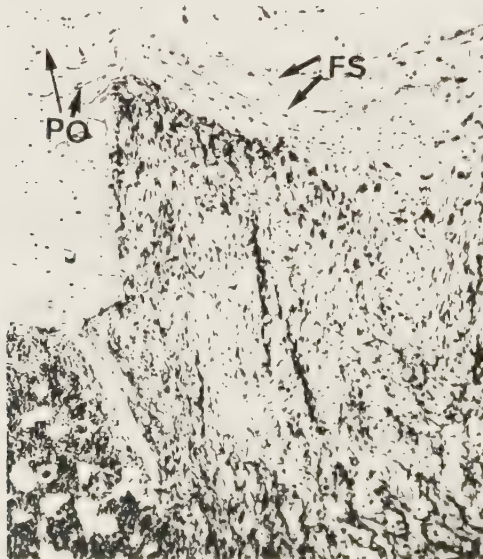


Abb. 13: Periostales Ödem am 3. Tag; eine Faserschicht (FS) überbrückt den periostalen Aspekt des Bohrlochdefektes; Periost (PO); HE-Färbung.

Beim Setzen des Bohrlochdefektes wurden die unmittelbar durch diesen Kortikalisabschnitt verlaufenden Osteone zerstört und der Blutfluß in den betroffenen Havers'schen Systemen unterbrochen. Dies hatte zur Folge, daß die Osteozyten in der unmittelbar proximal und distal an den Defekt angrenzenden Kortikalis der Nekrose anheim fielen. Schon ab dem 4. Tag fanden sich leere Osteozytenlakunen (Abb. 08). Der Bereich devitalisierten Knochens machte zu keinem Zeitpunkt mehr als bis zu 5 Osteozytenreihen vom Rande des Defektes aus. Auf diesem hatten sich früh Trabekel neuen Knochens gebildet, welche im Laufe der Umbauvorgänge rasch zu kompaktem Knochen umgebaut wurden. An der Grenzfläche zwischen totem und neugebildetem vitalem Knochen konnten nur sporadisch und dann örtlich sehr begrenzt Umbauvorgänge gefunden werden. So waren die Konturen selbst 32 Wochen nach Setzen des Defektes noch deutlich zu erkennen (Abb. 32).

3.2.2

Die Phase des kompakten Verschlusses des Bohrlochdefektes

Über die Versuchszeit von drei Jahren wurden insgesamt vier Kontrollgruppen angelegt. Zu den in den Jahren 1984 und 1986 durchgeführten Einzeildosisversuchen wurden parallel einmal 18 bzw. 25 Tiere (Tab. 06: Kontrolle 1 und 2) scheinbestrahlt. Zusätzlich wurden zu den Fraktionierungsexperimenten, sowie zu den Versuchen mit einem Intervall von sechs Monaten zwischen Bestrahlung und chirurgischem Eingriff Tiere als Kontrollgruppen 3 bzw. 4 (Tab. 07 und 08) in den Versuch genommen

Die Tiere wurden gleich den Einzeildosis- bzw.

Fraktionierungsversuchen vor Setzen des Defektes einmalig bzw. an 5 aufeinanderfolgenden Tagen scheinbestrahlt. Dazu wurden sie in der in Abschnitt 2.4.2. beschriebenen Weise für die Dauer der Bestrahlungszeit einer mittleren effektiven Dosis unter die abgeschaltete Röntgenröhre gelegt. Entsprechend den Bestrahlungsversuchen mit Einzeitdosen erfolgte der Eingriff 24 Stunden bzw. 6 Monate danach; entsprechend den Fraktionierungsversuchen erfolgte er 72 Stunden nach der

Tab. 06

Die Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes für die Kontrollgruppe 1 und 2 aufgelistet

Heilpe- riode [Wo]	Jahr	Anzahl Knochen [n]	knöchern Verschl. [%]	SEM	Mittel: 1984+1986 [%]
2	1986	3	51.3	4.8	--
3	1984	4	47.6	1.6	54.2
"	1986	4	61.0	1.9	
4	1984	3	54.8	3.8	65.8
"	1986	6	71.3	1.8	
5	1984	4	62.4	2.1	71.5
"	1986	6	75.8	2.2	
6	1984	6	73.8	3.8	--
7	1984	8	74.6	3.6	77.3
"	1986	6	81.1	1.6	
8	1984	7	91.7	1.8	87.5
"	1986	4	80.2	2.1	
9	1984	4	83.3	4.3	84.8
"	1986	4	86.3	3.6	
10	1986	6	88.1	2.1	--
16	1986	5	85.2	2.3	--
30	1986	3	91.2	2.0	--

fünften Scheinbestrahlung.

Aus den Kontrollgruppen eins bzw. zwei wurden, beginnend mit der 2. bzw. 3. Woche, in wöchentlichen Abständen bis zur 9. Woche, und in der Gruppe zwei zusätzlich zur 10., 16. und 30. Woche im Mittel 3 Tiere wiederum zufällig herausgegriffen und abgetötet. Die Schnittebene in Gruppe eins verlief gleichfalls parallel zur Höhe des Defektzylinders, während jene der Gruppe zwei senkrecht dazu und somit parallel zu seinem Querdurchmesser zu liegen kam. Der quantitative Verlauf des knöchernen Bohrlochverschlusses ist in Abb. 14 graphisch dargestellt.

In der 2. bis 3. Woche waren im Mittel 50% des Defektes, in der 5. Woche etwa 70% knöchern ver-

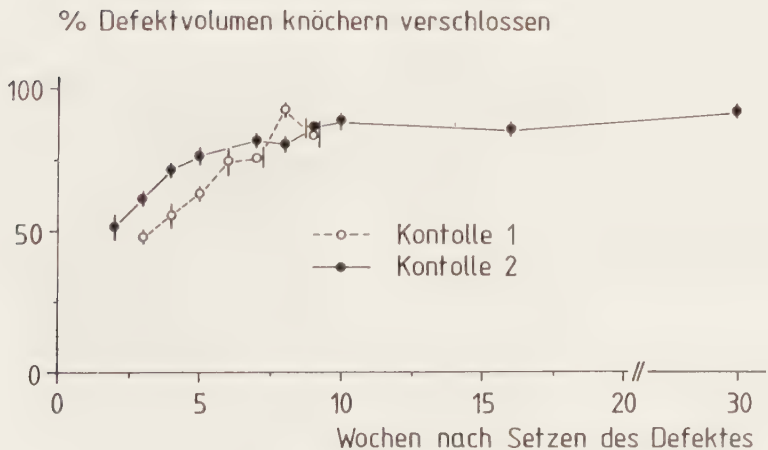


Abb. 14: Verlauf des knöchernen Bohrlochverschlusses im Rattenfemur in Abhängigkeit von der Heilperiode (Kontrolle 1 bzw. 2 wurden 1984 bzw. 1986 durchgeführt)

schlossen. In den folgenden 2 Wochen änderte sich dieser Wert nur unbedeutend, so daß in der 7. Woche wenig mehr als 75% des Defektvolumens kompakt verschlossen waren (Abb. 15 a-c).

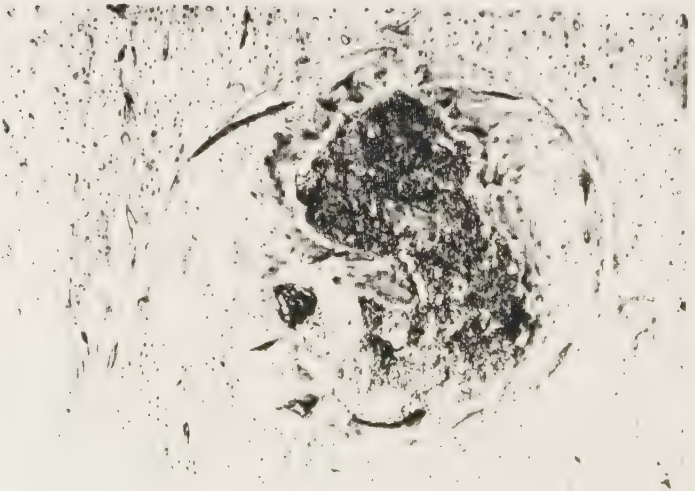
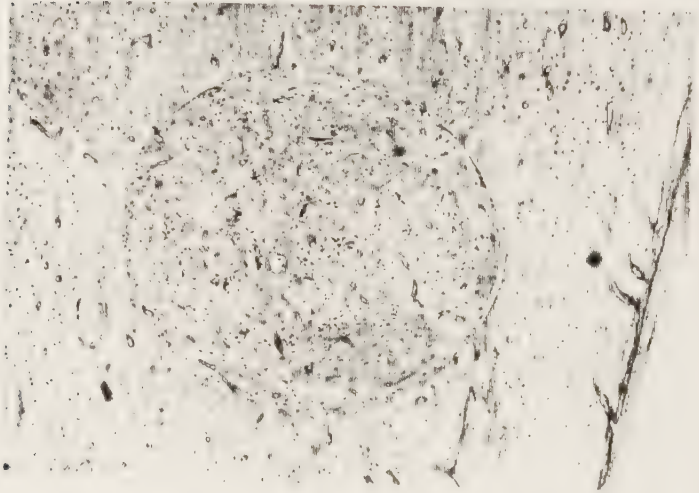


Abb. 15 a und b: HE-Färbung; Erläuterungen siehe Abb. 15c

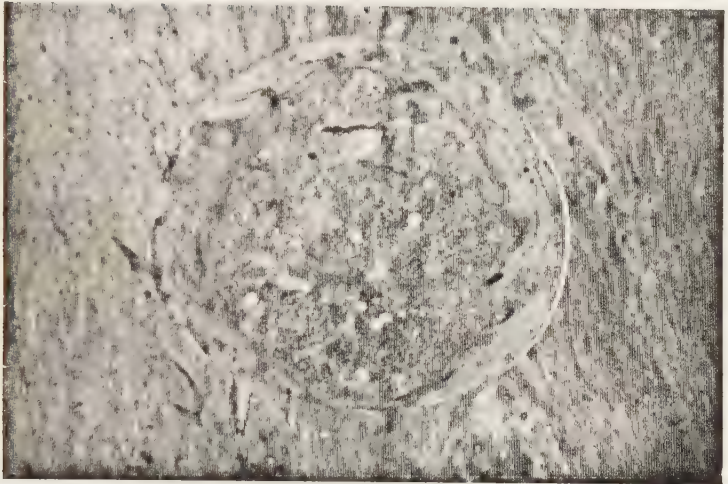


Abb. 15c: PAS-Färbung; Kompakter Verschluß des Defektes in der 6. Woche nach dem operativen Eingriff: (Abb. a) in der periost-nahen Schnittebene; (Abb. b und c) markwärtige Schnittebenen lassen zunehmend knochenfreie und von Markgewebe ausgefüllte Räume erkennen [b] und [c].

Zur 8. Woche stieg der knöchern verschlossene Anteil im Volumen des Bohrlochdefektes auf 85% an und blieb konstant bis zum Ende der Beobachtungszeit in der 30. Woche. Zu keinem Zeitpunkt nach Setzen des Defektes war dieser zu 100% knöchern verschlossen.

Während in den ersten 4 bis 5 Wochen die Apposition neuen Knochens das Geschehen dominiert, kommt es ab der 6. Woche zu einem Gleichgewicht zwischen Abbau und Anbau. An der markseitig gelegenen Oberfläche des den Defekt verschließenden Knochenpfropfes überwiegt die Apposition lamellären Knochens. Andererseits wird der periostale

Knochenüberschuß durch osteoklastische Aktivität zunehmend und bis zur 9. Woche vollständig abgebaut. In dieser Phase überwog zeitweilig auch das osteoklastische Moment geringgradig. So wurden in der 9. Woche etwas geringere Werte für den knöchernen verschlossenen Anteil des Defektvolumens gefunden als in der 8. Woche. Danach befindet sich das Geschehen in einem steady-state Zustand. Osteoplastische und osteoklastische Aktivität halten sich die Waage.

Die zwischen der 3. und 7. Woche gemittelten Werte lagen in der zweiten Kontrollgruppe im allgemeinen etwas über denjenigen der ersten. Wie schon erwähnt lagen die Schnittebenen in den beiden Gruppen senkrecht zueinander. An den parallel zur Höhe des Querdurchmessers gefertigten Schnitten der ersten Kontrollgruppe konnte die überschüssige end- und periostale Knochenzubildung



Abb. 16: Selbst 32 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff sind die Konturen des Defektes noch klar erkennbar; PAS-Färbung.

von der Messung ausgeschlossen werden. Diese ist jedoch in die Messungen der zweiten Kontrolle mit eingegangen, was eine Erklärung dafür sein mag, daß sie bis zur siebten Woche etwas über den Werten der ersten Kontrollgruppe liegen.

Auch 32 Wochen nach dem Setzen des Defektes waren die Konturen des gebohrten Hohlzylinders größtenteils noch deutlich auszumachen (Abb. 16). Das bedeutet, daß - zumindest bei der Ratte - die Remodellierungsaktivitäten von Seiten anliegender Osteone unbedeutend sind.

Um einen möglicherweise hemmenden Einfluß mehrerer, in unterschiedlichen Abständen aufeinander folgender Narkosen, wie an den Tieren während der Fraktionierungsversuche notwendig, auf die knöcherne Heilung im Bohrlochdefekt ausschließen zu können, wurde eine Gruppe von 9 Tieren über 5 Tage hinweg zweimal täglich in Narkose gelegt und scheinbestrahlt (Kontrollgruppe 3). Das Setzen des Bohrlochdefektes erfolgte 72 Stunden nach der letzten Scheinbestrahlung. Die in der 3., 4. bzw. 7. Woche gemittelten Werte sind in Tab. 07 aufgelistet. Sie lagen alle deutlich über den Kontrollwerten aus den Versuchen mit einer Fraktion, in denen der Defekt 24 Stunden nach einer einmaligen Scheinbestrahlung erfolgt war (Abb. 17). Es muß daher angenommen werden, daß wiederholtes Betäuben und Manipulieren der Tiere einen fördernden Einfluß auf die Frakturheilung ausübte.

Um den Einfluß des Alters der Tiere auf den Verlauf und das Ausmaß der Defektheilung zu untersuchen, wurden 14 Tiere mit 3 Monaten scheinbestrahlt. Der chirurgische Eingriff wurde 6 Monate später an den etwa 9 Monate alten Tieren durchgeführt. Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis

zur 6. Woche nach Setzen des Bohrlochefektes gemittelten Werte (Tab. 08) unterschieden sich nicht von denjenigen in den etwa 6 Monate jüngeren Kontrolltieren (Abb. 17).

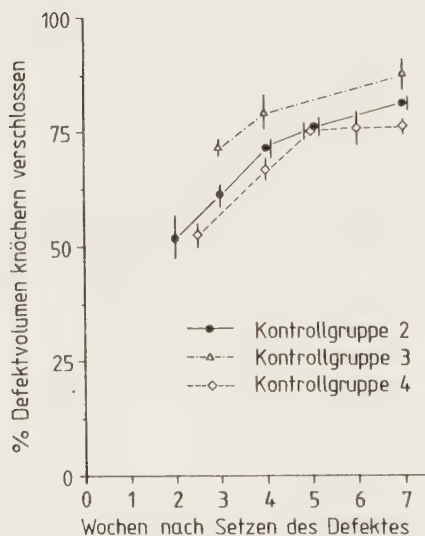


Abb. 17: Der Verlauf des knöchernen Verschlusses ist für Kontrolle 3 (fraktionierte Scheinbestrahlung) und Kontrolle 1 bzw. 4 (drei bzw. 9 Monate alte Tiere) gegen die Heilperiode aufgetragen.

Tab. 07 Die Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes für die mit fraktionierter Scheinbestrahlung vorbehandelten Tiere (Kontrollgruppe 3) aufgelistet

Wochen nach Setzen des Defektes	Anzahl-Knochen [n]	knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
3	5	71.8	1.3
4	5	79.2	3.7
7	5	87.7	3.8

Tab. 08 Die Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes für die im Alter von 9 Monaten und 6 Monate nach Scheinbestrahlung dem operativen Eingriff unterzogenen Tiere (Kontrollgruppe 4) aufgelistet

Wochen nach Setzen des Defektes	Anzahl-Knochen [n]	knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
2.5	8	52.5	2.4
4	8	66.9	1.5
5	6	74.8	2.1
6	6	75.6	3.4

3.3 Der Einfluß verschieden hoher Einzeitdosen einer 320 kV Röntgenstrahlung auf die Knochenheilung

3.3.1 Pathophysiologie der strahleninduzierten Störung früher Reparaturprozesse

Die frühen Phasen der Knochenheilung wurden nach Vorbestrahlung histologisch verfolgt. Dazu wurden jeweils 10 Tiere mit Einzeitdosen von 10 Gy, 15 Gy und 19 Gy 24 Stunden vor Setzen des Bohrlochdefektes vorbestrahlt. Die Tiere wurden am 1., 4., 7., sowie 14. und 21. Tag abgetötet. Nach histologischer Aufbereitung der Oberschenkelknochen wurde die Knochenheilung an sequentiellen Schnitten beurteilt.

Nach einer Einzeitdosis von 10 Gy setzten die initiale entzündliche Reaktion sowie die folgende proliferative Phase mit einer Verzögerung von einigen Tagen ein. Am vierten Tag erschien das Granulationsgewebe im Vergleich zu jenem in den Kontrolldefekten zell- und gefäßarm und mehr aufgelockert. Die Organisation des Fibringerinnsels war entsprechend verzögert. Osteoneogenese konnte weder zu diesem Zeitpunkt noch am 7. Tag beobachtet werden. Am 14. Tag entsprach das histologische Bild in etwa demjenigen in der Kontrolle am 7. Tag. Der Defekt war weitgehend mit einem sehr unreifen spongiösen Knochen ausgefüllt. Es hatte den Anschein, als würden die initialen Heilmeehanismen in dieser Dosisgruppe mit einer Verzögerung von etwa 1 Woche ablaufen. Doch schon ab der 3. Woche ist der Unterschied zur Entwicklung des Geschehens in der Kontrolle nicht mehr deutlich.

Vorbestrahlung mit 15 Gy führte zu einer deutlichen Störung der initialen Reparaturprozesse.

Bis zum 7. Tag fehlten die entzündliche Reaktion sowie Zell- und Gefäßproliferation vollständig. Ab dem 14. Tag war die Organisation des Fibringerinnsels gekennzeichnet durch das Einsprossen von einigen wenigen Kapillaren und das spärliche Einwandern von Zellen mit fibroblastenähnlichem Aussehen. In Marknähe konnte entlang der Innenwandung des Defektzylinders in der Hälfte der Tiere beginnende Neubildung eines, in seinem Aussehen sehr unreifen Knochens gefunden werden (Abb. 18). Die Osteoneogenese war bis zur 3. Woche stark gehemmt; die zu diesem Zeitpunkt untersuchten Bohrlochdefekte waren immer unvollständig mit spongiösem Knochen ausgefüllt.

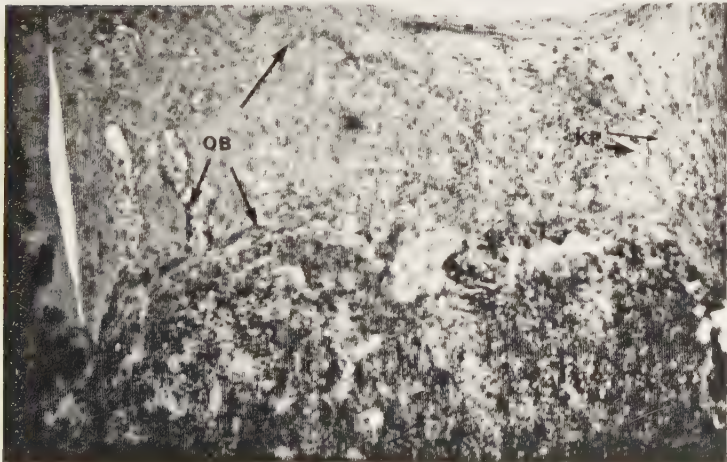


Abb. 18: Vorbestrahlung mit 15 Gy und einem Intervall von 24 Stunden führt zu einer erheblichen Verzögerung der Reparaturprozesse. Selbst 14 Tage nach Setzen des Defektes sind die Organisation des Fibringerinnsels sowie osteoplastische Reaktion (OB) und Kapillarsprossung (KP) gering, nur wenig neugebildeter Knochen ist zu finden; HE-Färbung.

Vorbestrahlung mit Einzeildosen von 19 Gy und mehr führte zu einer erheblichen Störung der Reparaturprozesse. Bis zur 3. Woche konnten in keinem der Präparate Anzeichen für eine entzündliche Reaktion gefunden werden. Zellproliferation bzw. Kapillarsprossung fehlten völlig (Abb. 19). Ab der 4. Woche konnte ein Minimum eines weitgehend unreifen neugebildeten Knochens gefunden werden. Der Rest des Defektes wurde von locker strukturiertem, zell- und gefäßarmem Fasergewebe ausgefüllt.

Auch im Mark konnten zum Teil erhebliche Verände-

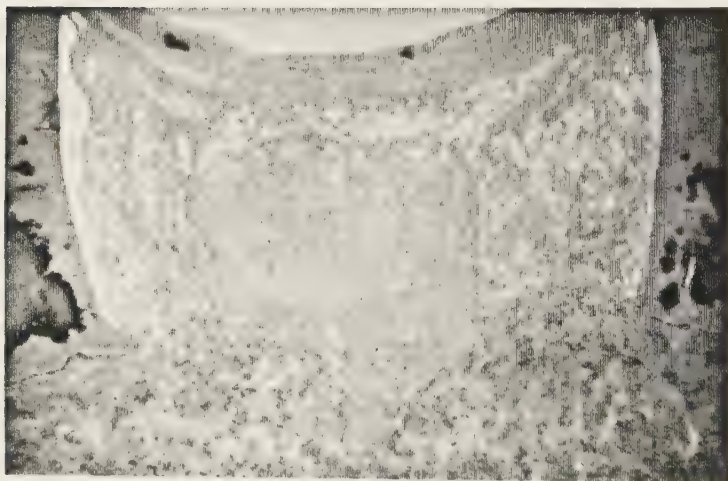


Abb. 19: Vorbestrahlung mit einer Einzeildosis von 19 Gy hemmt die Knochenheilung sehr. Drei Wochen nach Setzen des Defektes fehlen Anzeichen einer Granulationsgewebsbildung bzw. Knochenneubildung weitgehend; HE-Färbung.

rungen gefunden werden. In den Dosisgruppen ab 15 Gy war das histologische Bild am 2. Tag durch Zellarmut und Hämorrhagie gekennzeichnet. Die sinusoidalen Strukturen schienen vielerorts rupturiert. Zwei Tage später waren diese nach Vorbestrahlung mit 15 Gy offensichtlich wieder weitgehend hergestellt und auch die Markzellendichte hatte wieder zugenommen. Ab der 6. Woche war in dieser Dosisgruppe der Unterschied in der Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr deutlich. Nach 19 Gy und mehr war der Zellgehalt jedoch weiterhin reduziert und der Markraum durch Fettzellen und locker strukturiertes Fasergewebe ausgefüllt (Abb. 23 und 24).

3.3.2 Quantifizierung des zeitlichen Verlaufes der Defektheilung in Abhängigkeit der Dosis nach Vorbestrahlung

Um den Verlauf der Defektheilung in Abhängigkeit von der eingestrahlten Einzeildosis zu untersuchen, wurden 110 Tiere in den Versuch genommen (Einzeildosisgruppe 1986). Die Tiere wurden in fünf Gruppen unterteilt. Die Gruppe scheinbestrahlter Tiere wurde als Kontrolle 2 in Abschnitt 3.2 besprochen. Jene für die Einzeildosen von 10 Gy, 15 Gy und 19 Gy umfaßten jeweils 25 Tiere. In die Dosisgruppe von 22 Gy wurden 10 Tiere genommen. Die Bestrahlung der Tiere erfolgte 24 Stunden vor Setzen des Bohrlochdefektes. Mit der 3. bzw. 4. Woche beginnend, wurden in wöchentlichen Abständen bis zur 10. Woche und zusätzlich in der 16. und 30. Woche nach dem chirurgischen Eingriff im Mittel 3 Tiere zufällig aus den Gruppen herausgegriffen, abgetötet und

die entnommenen Oberschenkelknochen histologisch aufbereitet. Die gemittelten Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit von der Dosis und vom Untersuchungszeitpunkt aufgelistet (Tab. 9-12).

Nach einer Einzeitdosis von 10 Gy war der Defekt zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant mehr knöchern verschlossen als die Kontrolle (Abb. 20). Auch verlief die initiale Phase der Knochenheilung steiler. Schon in der 6. Woche waren im Mittel 95% des Defektvolumens knöchern verschlossen. Für die Dauer der folgenden Beobachtungszeiten blieb dieser Wert konstant.

Nach 15 Gy waren in der 4. Woche im Mittel 43% des Defektvolumens knöchern zugewachsen. Das entsprach 57% der in den Kontrolltieren zu diesem Zeitpunkt gemittelten Werte. Offensichtlich etwas später als in der Kontrolle einsetzend, war die initiale Phase der Knochenheilung durch einen starken Anbau neuen Knochens gekennzeichnet. Schon in der 5. Woche sind 80% des Bohrlochdefektes verschlossen, was dem Wert der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt entspricht.

Während der nächsten beiden Wochen bestimmte das osteoklastische Moment den Fortgang der Heilung. Durch zunehmenden Abbau neugebildeten Knochens fielen die Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Bohrloch auf 72% bzw. 61% in der 6. bzw. 7. Woche. Sie lagen signifikant ($p=0.10$) unter jenem der 5. Woche. Ab der 8. Woche überzog wieder der Knochenanbau; schon ab der 10. Woche unterschieden sich die Werte nicht mehr von jenen der Kontrollgruppe.

In den höheren Dosisgruppen setzte die initiale Phase der Defektheilung zunehmend später ein.

Nach einer Einzeitdosis von 19 Gy lag der knöchern verschlossene Anteil des Defektes in der 4. Woche bei weniger als 5%. Bis zur 7. Woche stieg er auf 30% an, um anschließend bis zur 10. Woche wieder auf 15% abzufallen. Wiederum folgte auf eine durch vehemente Knochenneubildung geprägte initiale Phase eine Phase, in der Knochenabbau das Geschehen beherrscht. Zu einem späteren Zeitpunkt nach der 16. Woche überwiegt wiederum der Knochenanbau. In der 30. Woche waren 45% des Defektvolumens knöchern verschlossen.

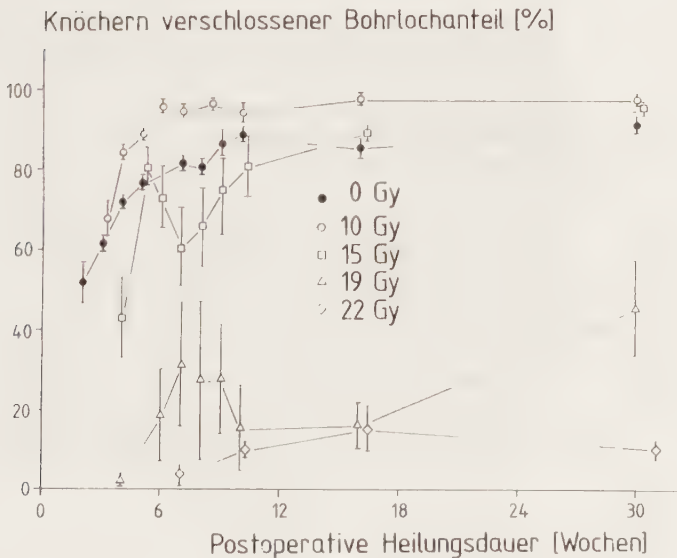


Abb. 20: Zeitlicher Ablauf der knöchernen Verheilung des Bohrlochdefektes nach verschiedenen Strahlendosen, appliziert jeweils 24 Stunden vor der Operation.

Nach einer Einzeitdosis von 22 Gy findet nur mehr minimaler Knochenanbau statt. Der neugebildete Knochen wurde hauptsächlich entlang der Innenwand des Defektzylinders abgelagert. Er war relativ zellarm und ließ eine mehr oder minder faserige Struktur erkennen. Aktive Osteoblasten konnten weder entlang der Innenwandung des Defektzylinders noch entlang der Flächen des neugebildeten Knochens gefunden werden (Abb. 24). Der knöchern verschlossene Anteil im Defektvolumen überschritt zu keinem Zeitpunkt 15%.

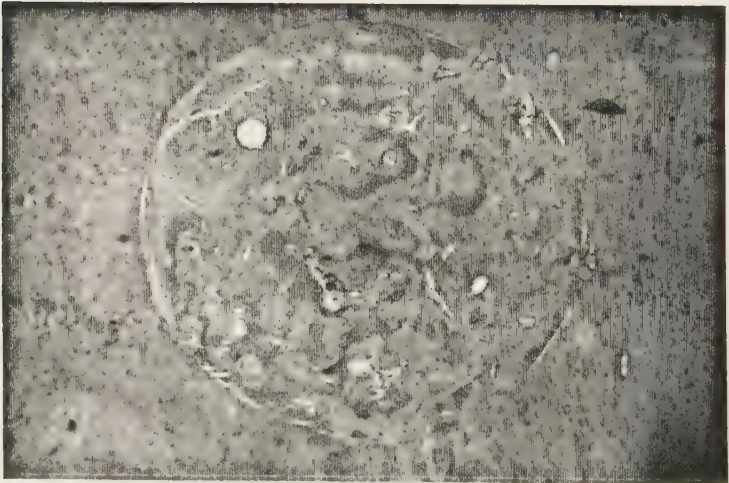


Abb. 21: Bohrloch in der 6. Woche nach 10 Gy; PAS-Färbung.

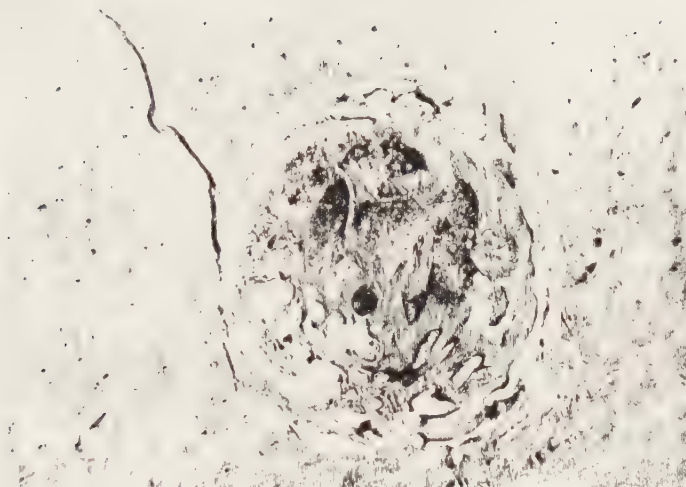


Abb. 22a: Bohrloch in der 4. Woche nach 15 Gy: der neugebildete Knochen erscheint noch sehr unreif; Azan-Färbung [a].

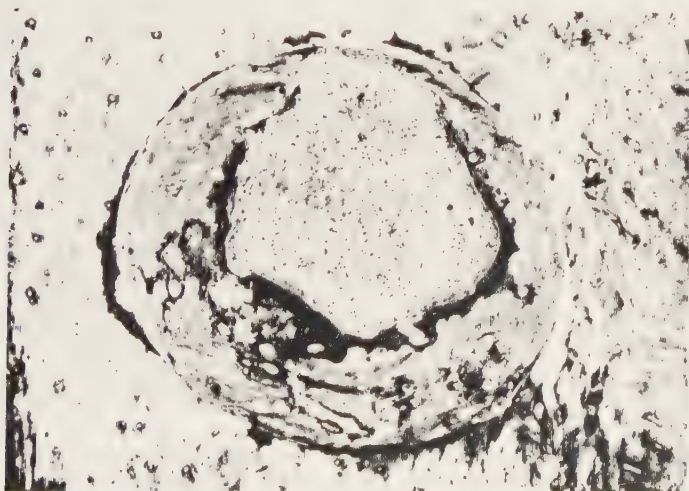


Abb. 22b: Bohrloch in der 7. Woche nach 16 Gy; Goldner-Färbung.



Abb. 13) In den mit 19 Gy vorbestrahlten Tieren wird nur noch wenig Knochen neugebildet. Dieser erscheint jedoch vital und ist mit unterschiedlich aktiven Osteoblasten ausgestattet. Der größte Anteil des Knochens wird von einem lockeren und zellarmen Stützgewebe ausgefüllt; Goldner-Färbung.



Abb. 14) In den mit Strahlendosen über 19 Gy vorbestrahlten Tieren erscheint die Knochenheilung erheblich gestört. In der 7. Woche wird wenig zellarmes Knochen im Schilachdefekt gefunden, dem Osteoplastenzone weitgehend fehlend (Goldner-Färbung).

Tab. 09 Mit 10 Gy und einem Intervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und Setzen des Defektes durchgeführte Einzeitdosisversuche (1986): Die gemittelten Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit der Heilperiode aufgelistet

Wochen nach Setzen des Defektes	Anzahl-Knochen [n]	knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
3	6	67.2	4.5
4	5	83.7	2.2
5	6	87.7	1.0
6	5	95.1	1.5
7	5	93.7	1.7
8.5	7	95.7	0.8
10	6	94.1	2.0
16	6	97.0	0.7
30	5	98.6	0.5

Tab. 10 Mit 15 Gy und einem Intervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und Setzen des Defektes durchgeführte Einzeitdosisversuche (1986): Die gemittelten Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit der Heilperiode aufgelistet

Wochen nach Setzen des Defektes	Anzahl-Knochen [n]	knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
4	5	42.5	9.9
5	6	80.2	4.8
6	5	71.5	8.1
7	6	59.7	10.3
8	6	65.2	9.8
9	6	23.9	12.7
10	6	80.5	7.5
16	5	89.3	3.0
30	5	95.1	1.2

Tab. 11 Mit 19 Gy und einem Intervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und Setzen des Defektes durchgeführte Einzeitdosisversuche (1986): Die gemittelten Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit der Heilperiode aufgelistet

Wochen nach Setzen des Defektes	Anzahl- Knochen [n]	knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
4	6	1.8	0.8
6	8	17.9	11.5
7	6	30.9	15.6
8	4	26.9	20.5
9	6	26.6	14.0
10	6	14.5	11.4
16	5	16.2	6.1
30	6	44.9	13.5

Tab. 12 Mit 22 Gy und einem Intervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und Setzen des Defektes durchgeführte Einzeitdosisversuche (1986): Die gemittelten Werte für den knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind in Abhängigkeit der Heilperiode aufgelistet

Wochen nach Setzen des Defektes	Anzahl- Knochen [n]	knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
7	5	4.2	2.3
10	4	9.7	1.7
16	5	14.7	5.6
30	3	9.8	2.1

3.3.3

Dosisabhängige Strahlenwirkung auf die Defektheilung nach Einzeitbestrahlung

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß nach Ablauf von 6 bis 7 Wochen die initiale Phase der Knochenneubildung sowohl in den Kontrolltieren wie auch nach Bestrahlung weitgehend abgeschlossen war. Für die weiteren Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten Heilungsstörung wurde daher einheitlich dieses postoperative Intervall verwendet.

Die in dem oben genannten Versuch zu diesem Zeitpunkt ermittelten Daten sind denjenigen aus einem

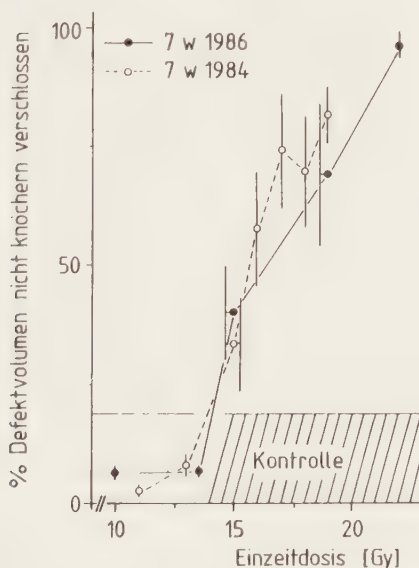


Abb. 23: Dosisabhängigkeit der Knochenheilungsstörung. Die knöcherne Verheilung nach 7-wöchiger Heilungsdauer ist für zwei identische Versuche (1984 bzw. 1986) gegen die 24 Stunden vor der Operation eingestrahlte Dosis aufgetragen (w: Wochen).

Vorversuch gegenübergestellt (Tab. 13). In diesem (Einzeitdosisgruppe 1984) waren 48 Tieren wiederum 24 Stunden vor Setzen des Defektes Einzeitdosen von 11-19 Gy lokal eingestrahlt worden. Sechs und 7 Wochen später waren im Mittel 4 Tiere pro Dosisgruppe abgetötet und die Masse neugebildeten Knochens im Bohrloch gemessen worden. Die Daten aus den beiden Versuchen stimmen in den jeweiligen Dosisgruppen sehr gut überein (Abb. 23).

Die lokale Anwendung unterschiedlich hoher Einzeitdosen einer 320 kV Röntgenstrahlung 24 Stunden vor dem chirurgischen Eingriff führte zu einer mit der Dosis zunehmenden Reduzierung des knöchern verschlossenen Volumens im Bohrlochdefekt. Die Dosiswirkungsbeziehung verläuft relativ steil (Abb. 23). Nach 13 Gy war der Defekt bedeutend dichter kompakt verschlossen als bei den Kontrolltieren. Mit steigender Dosis verringerte sich jedoch der knöchern verschlossene Anteil zunehmend und betrug nach einer Dosis von 19 Gy in beiden Versuchen übereinstimmend 23%. Nach einer Dosis von 22 Gy und mehr wurde nur noch selten und wenn, dann ein im Aussehen atypischer und größtenteils avitaler Knochen gefunden.

Die $ED_{50/40\%}$, das ist die Dosis, bei der die Hälfte der Bohrlöcher weniger als 40% knöchern verschlossen war, berechnete sich 1984 auf 15.8 Gy und 1986 auf 16.7 Gy (Abb. 24). Im folgenden wurden die Daten aus den beiden Versuchen gemeinsam analysiert.

So wurde in Abb. 25 der Prozentsatz der Bohrlöcher, die in der 6. bzw. 7. Woche weniger als 40% knöchern verschlossen waren, gegen die Dosis aufgetragen. Es fand sich kein Unterschied zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten.

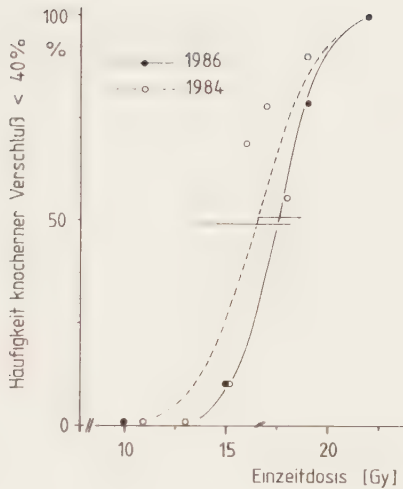


Abb. 24: Dosisabhängigkeit der Knochenheilungsstörung nach Vorbestrahlung mit verschiedenen Einzeildosen und einem Intervall von 24 Stunden. Zur Quantifizierung wurde die Häufigkeit von Probanden herangezogen, die ein vorgegebenes Heilungsniveau (40% knöcherner Verschluß) nach 7 Wochen Heilperiode nicht erreichten. Probit-Analyse der in Abb. 23 dargestellten Rohdaten (Irrtumsbalken: 95% Vertrauensbereich).

Die Prozentsätze der Bohrlöcher, die weniger als 60%, 50% bzw. 40% knöchern verschlossen waren, sind in Abbildung 26 gegen die Dosis aufgetragen. Die Dosen, bei der die Hälfte der untersuchten Bohrlöcher den jeweiligen Effekt zeigte (ED_{50}), berechneten sich auf 15.7 Gy, 16.0 Gy bzw. 16.6 Gy und unterschieden sich nicht bedeutend voneinander. Diese gute Übereinstimmung bezüglich des Wirkungsniveaus traf ebenso für alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zu.

Für die 1986 mit einem Intervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und Setzen des Defektes

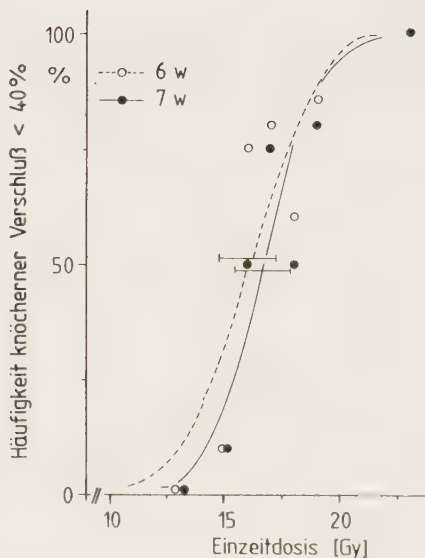


Abb. 25: Dosisabhängigkeit der Knochenheilungsstörung nach Vorbestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen und einem Intervall von 24 Stunden für eine 6 bzw. 7 wöchentliche Heilperiode (Einzeildosisversuche 1984 und 1986)

durchgeführten Einzeilversuche wurden die gemittelten Werte für die Heilperioden von 10 Wochen, 16 bzw. 30 Wochen gegen die Dosis aufgetragen und mit jenen für 6 und 7 Wochen verglichen (Fig. 27). Die gemittelten Daten stimmten für die 10. Woche gut mit diesen überein. Dagegen war bei längerer Heilperiode (16 bzw. 30 Wochen) nach 15 und 19 Gy ein deutlich geringerer Effekt zu registrieren.

Die Häufigkeiten der Bohrlöcher, die nach den jeweiligen Heilperioden weniger als 40% knöchern verschlossen waren, sind in Figur 28 gegen die Dosis aufgetragen. Für die Heilperioden von 6 und

7 Wochen bzw. 10 Wochen ließen sich die resultierenden Dosiswirkungsbeziehungen graphisch nicht voneinander trennen ($ED_{50/40\%} = 16.6-16.8 \text{ Gy}$).

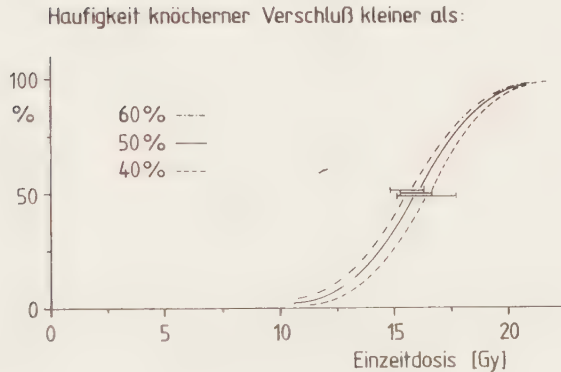


Abb. 26: Dosisabhängigkeit der Heilungsstörung nach Vorbestrahlung mit Einzeiddosen (24-h-Intervall). Die ED_{50} -Werte wurden aus den für verschiedene vorgegebene Heilungsniveaus quantalisierten Rohdaten nach Probit berechnet.

Für die Heilperiode von 16 Wochen verläuft die Dosiswirkungskurve zwar steiler, der $ED_{50/40\%}$ Wert von 17.0 Gy unterscheidet sich jedoch nur geringfügig von jenen für die kürzeren Heilperioden. Für die 30. Woche liegt der $ED_{50/40\%}$ Wert (19.4 Gy) um etwa 2.5 Gy deutlich darüber.

Bei der Tendenz zu ansteigenden isoeffektiven Dosen mit zunehmender Länge der Heilperiode kommt zum Ausdruck, daß selbst nach relativ hohen Einzeiddosen bis zu 19 Gy noch Knochenneubildung beobachtet werden konnte, diese jedoch zunehmend später einsetzte.

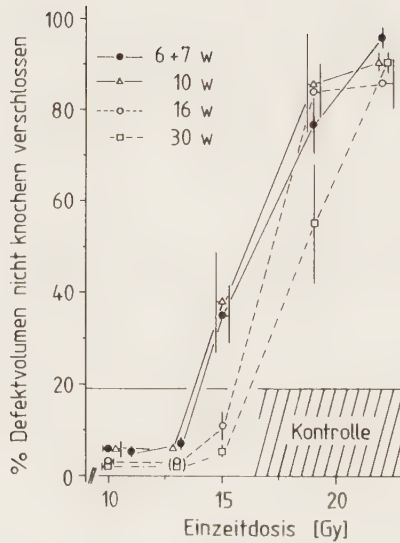


Abb. 27: Der Anteil knöchern verschlossenen Defektvolumens ist in Abhängigkeit der mit einem zeitlichen Abstand von 24 Stunden vor dem chirurgischen Eingriff eingestrahlt Dosis für die verschiedenen Heilperioden (6 und 7, 10, 16 und 30 Wochen) aufgetragen.

Häufigkeit knöcherner Verschluß < 40%

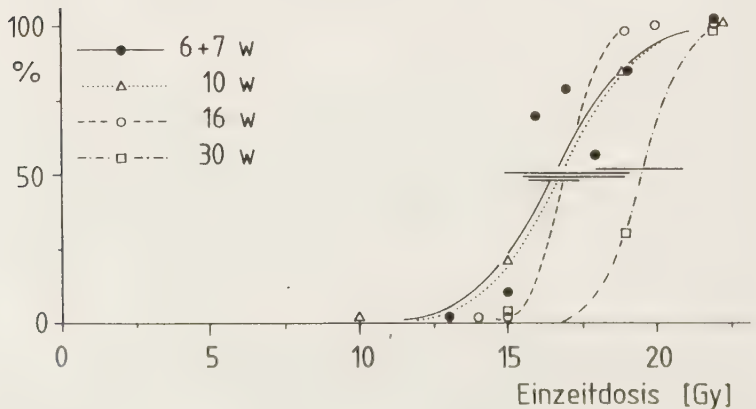


Abb. 28: Dosisabhängigkeit der Knochenheilungsstörung für verschiedene Heilperioden. Probitanalyse der in Abb. 27 dargestellten Rohdaten.

Tab. 13

Durchgeführte Versuche mit unterschiedlichen Einzelzeitdosen und einem Intervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und chirurgischem Eingriff

Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen 1984 und 1986 sind für die Heilperioden von 6 und 7 Wochen in Abhängigkeit von der Dosis aufgelistet.

Dosis in [Gy]	Jahr	Heilpe- riode [Wo]	Anzahl Knochen [n]	nicht knöch. verschl. [%]	SEM	Mittel: 1984+1986 6 + 7 Wo
10	1986	6	5	4.9	1.5	5.6
"	"	7	5	6.3	1.7	
11	1984	6	6	6.4	0.8	5.0
"	"	7	3	2.2	0.9	
13	1984	6	5	5.8	1.0	6.9
"	"	7	4	8.3	2.7	
15	1984	6	6	31.0	12.8	33.5
"	"	7	4	33.1	10.4	
15	1986	6	5	28.5	8.1	
"	"	7	6	40.3	10.3	
16	1984	6	8	77.3	10.4	67.2
"	"	7	8	57.2	12.6	
17	1984	6	10	84.1	4.9	79.6
"	"	7	8	74.1	12.6	
18	1984	6	10	55.2	11.8	61.5
"	"	7	8	69.3	10.0	
19	1984	6	6	73.7	12.1	76.6
"	"	7	4	81.1	6.5	
19	1986	6	8	82.1	11.5	
"	"	7	6	69.1	15.6	
22	1986	7	5	95.8	2.3	95.8

3.4

Der Einfluß der Zeit zwischen Bestrahlung und chirurgischem Eingriff auf die Defektheilung in Abhängigkeit der Dosis

Der Einfluß verschieden langer Zeitintervalle von 1 Woche bis zu 6 Monaten zwischen Bestrahlung und dem Setzen des Bohrlochdefektes sollte untersucht werden. In fünf unterschiedlich großen, zwischen 25 und 35 Ratten umfassenden Gruppen wurden diese mit Einzeitdosen zwischen 10 Gy und 20 Gy bestrahlt. Je nach Gruppenzugehörigkeit erfolgte der chirurgische Eingriff eine, vier, sieben bzw. zehn Woche(n) oder sechs Monate später. Sechs bzw. 7 Wochen danach wurden jeweils 3 bis 4 Tiere randomisiert aus den jeweiligen Dosisgruppen herausgegriffen, abgetötet und, im Anschluß an die histologische Aufbereitung, der knöchern verschlossene Anteil im Volumen des Bohrlochdefektes bestimmt.

Die für die Heilperioden von 6 und 7 Wochen gemittelten Werte unterschieden sich innerhalb gleicher Dosisgruppen eines Versuches (Tab. 15 und 16) nicht signifikant voneinander. Sie wurden daher zusammengefaßt ausgewertet (Tab. 17).

Der Effekt der lokalen Applikation verschieden hoher Einzeitdosen von 1 Woche bis zu 6 Monaten vor dem Setzen des Bohrlochdefektes wurde in Abb. 29-33 jeweils mit den Ergebnissen des 24-Stunden-Intervalls verglichen. Die Dosiswirkungsbeziehungen für die untersuchten Intervalle verliefen relativ einheitlich und steil zwischen 12 Gy und 20 Gy. Auch unterschieden sich die gemittelten Werte innerhalb gleicher Dosisgruppen häufig nicht signifikant voneinander und von jenen aus den 24-Stunden-Intervall-Versuchen.

% Defektvolumen nicht knöchern verschlossen

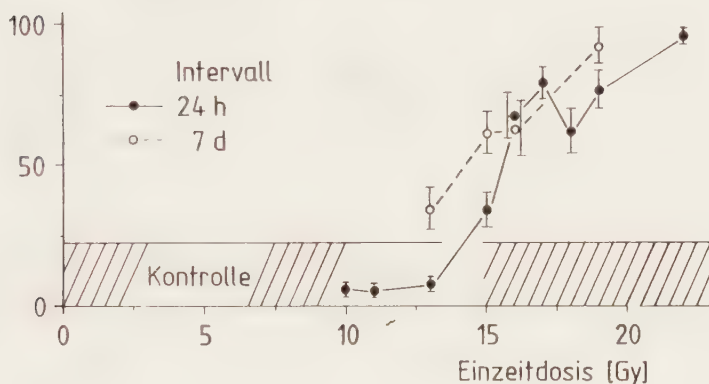


Abb. 29: Einzeiddosiseffekte bei Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen Vorbestrahlung und operativem Eingriff von 24 Stunden auf 7 Tage; (6 bis 7 wöchentliche Heilperiode).

% Defektvolumen nicht knöchern verschlossen

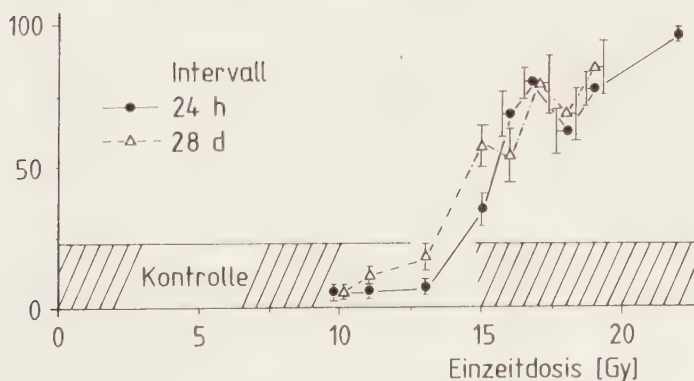


Abb. 30: Einzeiddosiseffekte bei Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen Vorbestrahlung und operativem Eingriff von 24 Stunden auf 28 Tage; (6 bis 7 wöchentliche Heilperiode).

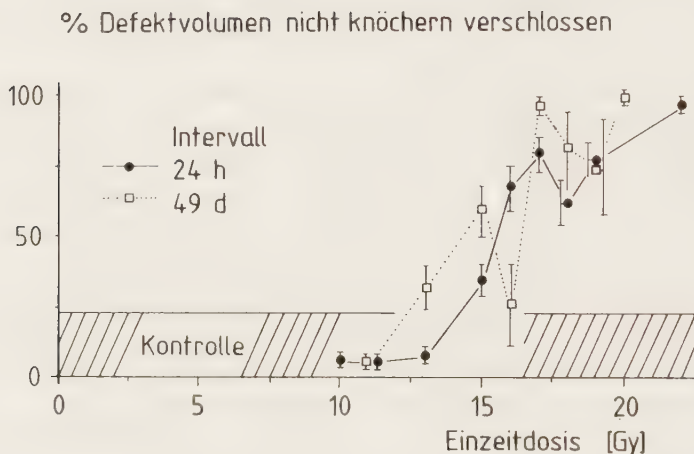


Abb. 31: Einzeildosiseffekte bei Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen Vorbestrahlung und operativem Eingriff von 24 Stunden auf 49 Tage; (6 bis 7 wöchentliche Heilperiode).

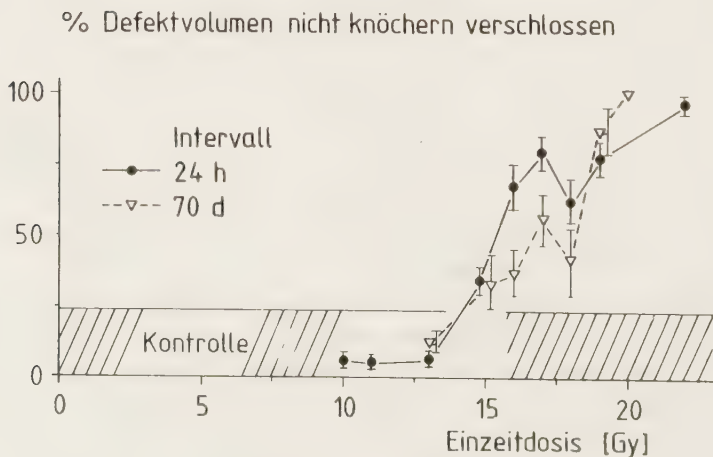


Abb. 32: Einzeildosiseffekte bei Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen Vorbestrahlung und operativem Eingriff von 24 Stunden auf 70 Tage; (6 bis 7 wöchentliche Heilperiode).

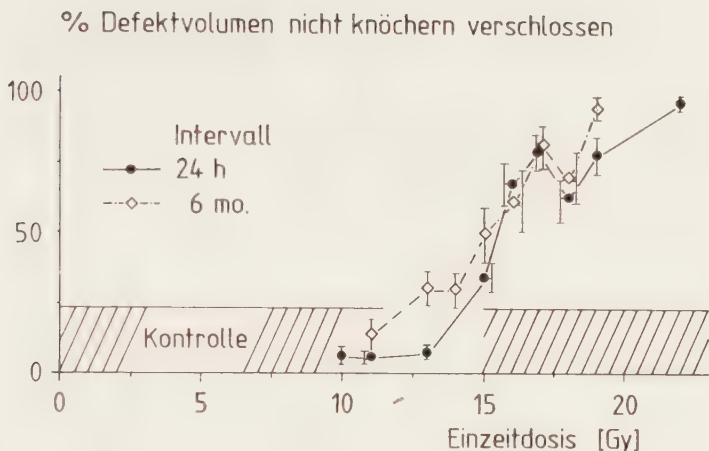


Abb. 33: Einzeildosiseffekte bei Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen Vorbestrahlung und operativem Eingriff von 24 Stunden auf 6 Monate; (6 bis 7 wöchentliche Heilperiode).

Für die verschiedenen Intervalle wurden die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Dosis auf die Wahrscheinlichkeit hin untersucht, daß das Defektvolumen weniger als 40% knöchern verschlossen ist (Fig. 34 und 35). Die $ED_{50/40\%}$ berechnete sich auf 16.6 Gy, 15.9 Gy sowie 16.2 Gy und 15.7 Gy für die Intervalle von 24 Stunden, 1 Woche sowie 4 und 7 Wochen. Für solche von 10 Wochen und 6 Monaten ließ sich eine $ED_{50/40\%}$ von 17.5 Gy und 16.0 Gy ermitteln. Diese Werte waren nicht signifikant verschieden. Nur für das Intervall von 10 Wochen lag die mittlere effektive Dosis um 0.9 Gy über jener für das 24 Stunden Intervall und um 1.8 Gy über der niedrigsten für das Intervall von 7 Wochen.

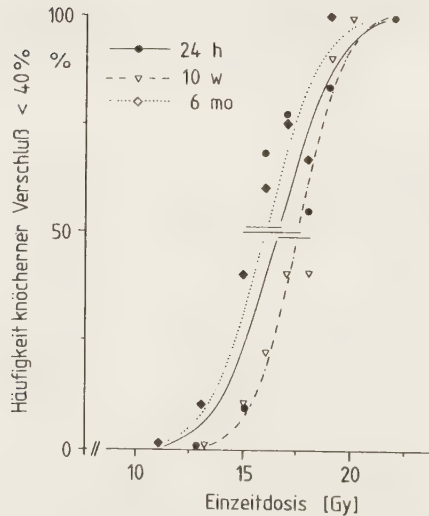
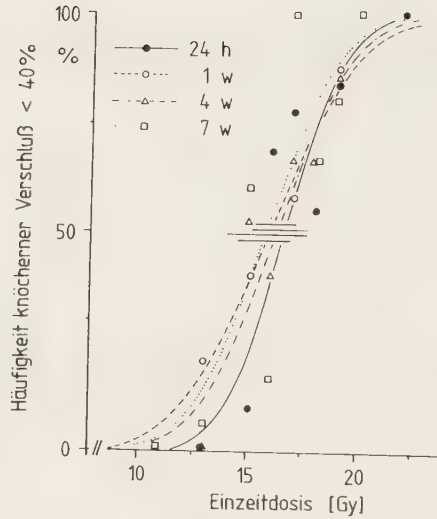


Abb. 34: Dosisabhängigkeit der Knochenheilungsstörung: Die Wirkung des zeitlichen Abstandes zwischen operativem Eingriff und Vorbestrahlung wurde untersucht. Zur Quantifizierung wurde wiederum die Häufigkeit der Probanden herangezogen, die ein vorgegebenes Heilungsniveau (40% Verschluß) im Anschluß an eine 6 bis 7-wöchentliche Heilperiode nicht erreichten. Probitanalyse der in Abb. 29 bis 33 dargestellten Rohdaten.

Tab. 14

Durchgeführte Versuche mit unterschiedlichem Intervall zwischen Vorbestrahlung und chirurgischem Eingriff: Die Werte für den nicht knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind für die Heilungsperiode von 6 Wochen gemittelt

Intervall in [Wo]	Gesamt dosis [Gy]	Anzahl- Knochen [n]	nicht knöchern verschlossener Anteil [%]	mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	13	6	31.8	9.9
"	15	6	61.2	11.4
"	17	6	50.6	11.6
"	19	4	99.6	0.2
4	10	6	5.8	1.4
"	11	6	13.8	5.1
"	13	4	20.4	10.2
"	15	11	60.8	9.5
"	16	6	68.2	12.9
"	17	5	71.8	16.8
"	18	10	67.7	12.5
"	19	4	77.1	17.8
7	11	1	3.9	--
"	13	4	39.3	15.4
"	15	5	62.7	12.0
"	18	3	79.1	20.9
10	13	3	19.3	8.5
"	15	6	26.1	9.5
"	16	5	38.6	13.1
"	17	6	56.6	12.1
"	18	6	54.8	16.5
"	19	6	81.7	13.5
"	20	3	99.9	
32	11	5	20.0	8.4
"	13	6	22.1	8.0
"	14	4	31.7	7.2
"	15	6	53.6	11.8
"	16	6	85.0	7.0
"	17	4	77.6	13.4
"	18	6	60.9	14.5
"	19	3	93.6	6.4

Tab. 15

Durchgeführte Versuche mit unterschiedlichem Intervall zwischen Vorbestrahlung und chirurgischem Eingriff: Die Werte für den nicht knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind für die Heilungsperiode von 7 Wochen gemittelt

Intervall in [Wo]	Gesamt dosis [Gy]	Anzahl- Knochen [n]	nicht knöchern verschlossener Anteil [%]	mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	13	4	38.3	12.6
"	15	4	61.9	8.3
"	17	6	75.0	14.4
"	19	4	84.0	13.0
4	10	4	4.5	1.0
"	11	5	6.2	2.8
"	13	5	13.1	4.8
"	15	8	49.3	9.3
"	16	4	30.0	13.8
"	17	4	86.0	12.8
"	18	11	66.7	9.5
"	19	3	93.2	6.8
7	11	4	5.8	1.4
"	13	5	25.1	1.9
"	15	5	56.6	15.5
"	16	6	25.1	15.4
"	17	6	95.6	2.7
"	18	3	82.3	17.7
"	19	5	74.1	17.9
"	20	6	98.6	1.4
10	13	4	5.1	1.1
"	15	4	42.7	20.8
"	16	4	32.6	9.3
"	17	4	51.8	16.2
"	18	4	45.9	15.9
"	19	4	94.3	2.1
"	20	2	99.9	--
32	11	4	5.9	1.6
"	13	4	39.6	10.8
"	14	3	25.4	12.3
"	15	4	41.5	16.5
"	16	4	22.7	5.9
"	17	4	82.5	8.9
"	18	3	86.8	5.6
"	19	3	95.9	3.2

Tab. 16

Durchgeführte Versuche mit unterschiedlichem Intervall zwischen Vorbestrahlung und chirurgischem Eingriff: Die Werte für den nicht knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind für Heilungsperioden von 6 bis 7 Wochen gemittelt

Intervall in [Wo]	Gesamt dosis [Gy]	Anzahl- Knochen [n]	nicht knöchern verschlossener Anteil [%]	mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	13	10	34.4	7.4
"	15	10	61.5	7.2
"	17	12	62.8	9.5
"	19	8	91.8	6.7
4	10	10	5.3	0.9
"	11	11	10.3	3.1
"	13	9	16.4	5.2
"	15	19	56.0	7.1
"	16	10	52.9	10.9
"	17	9	78.1	10.6
"	18	21	67.2	7.9
"	19	7	84.0	10.4
7	11	5	5.4	1.1
"	13	9	31.4	6.9
"	15	10	59.7	9.3
"	18	6	80.7	12.3
10	13	7	11.2	4.3
"	15	10	32.8	9.7
"	16	9	35.9	8.0
"	17	10	54.7	9.2
"	18	10	51.3	11.2
"	19	10	86.7	8.1
"	20	5	99.9	
32	11	9	13.7	5.1
"	13	10	29.1	6.7
"	14	7	29.0	6.2
"	15	10	48.7	9.3
"	16	10	60.1	11.2
"	17	8	80.1	7.5
"	18	9	69.5	10.4
"	19	6	94.8	3.2

3.5

Der Einfluß fraktionierter Strahlendosen auf die Knochenheilung im Rattenknochen

Um die Erholung vom subletalen Strahlenschaden in den Geweben zu untersuchen, von denen die Knochenheilung ausgeht, wurden Fraktionierungsversuche durchgeführt. Dazu wurden jeweils etwa 32 Tieren insgesamt zwei bzw. drei Fraktionen, d.h. jeweils eine am ersten und fünften bzw. am ersten, dritten und fünften Tag eingestrahlt. Jeweils 22 weiteren Tieren wurden insgesamt fünf Fraktionen im Abstand von 24 Stunden bzw. insgesamt 10 Fraktionen, das bedeutet an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 2 (zeitlicher Mindestabstand 8 Stunden), appliziert. Die Gesamtbehandlungszeit für die fraktionierte Bestrahlung betrug somit konstant 96 Stunden. Die Dosis pro Fraktion variierte zwischen den Gruppen; sie war innerhalb einer Gruppe jedoch konstant.

Der chirurgische Eingriff erfolgte 72 Stunden nach der letzten Fraktion, d.h. am 7. Tage nach Beginn des Versuchs. Nach einer Heilperiode von 6 bzw. 7 Wochen wurden 3 bis 4 Tiere pro Dosisgruppe abgetötet und der nicht knöchern verschlossene Anteil im Defektvolumen bestimmt (Tab. 19 und 20).

In Figur 36 wurden die in der 6. bzw. 7. Woche gemittelten Werte für diesen Versuch gegen die Gesamtdosis aufgetragen und mit jenen aus dem Einzeitdosisversuch, der mit einem Intervall von 7 Tagen zwischen Bestrahlung und chirurgischem Eingriff durchgeführt worden war, verglichen. Die in der 6. und 7. Woche gemittelten Werte unterschieden sich innerhalb eines Versuches und einer Dosisgruppe nicht signifikant voneinander und wurden daher in Figur 37 zusammenfassend dargestellt.

Ein ausgeprägter Fraktionierungseffekt ist erkennbar. Die isoeffektiven Gesamtdosen nehmen zu mit abnehmender Dosis pro Fraktion. Die Dosiswirkungskurven lassen zudem einen zunehmend flacheren Verlauf mit steigender Fraktionenzahl erkennen.

Für die verschiedenen Fraktionierungsschemata wurden die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Gesamtdosis auf die Wahrscheinlichkeit hin untersucht, daß das Defektvolumen weniger als 40% knöchern verschlossen ist (Fig. 38). Die $ED_{50/40\%}$ -Werte berechneten sich auf 15,9 Gy für den Einzelversuch, auf 21,6 Gy bzw. 25,7 Gy für 2 bzw. 3 Fraktionen und auf 33 Gy bzw. 40,9 Gy für 5 bzw. 10 Fraktionen.

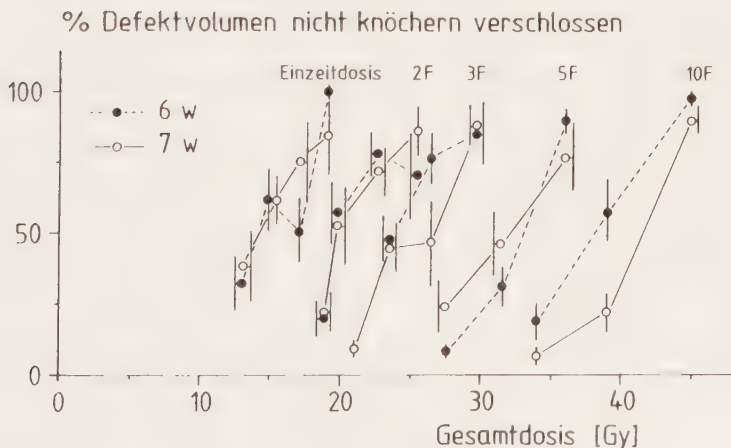


Abb. 36:

Dosiseffekte auf die knöcherne Heilung im Bohrlochdefekt in Abhängigkeit von der Dosisfraktionierung bei präoperativer Bestrahlung. Das chirurgische Trauma wurde jeweils 7 Tage nach der 1. Fraktion gesetzt (getrennt untersucht für Heilperioden von 6 bzw. 7 Wochen).

% Defektvolumen nicht knöchern verschlossen

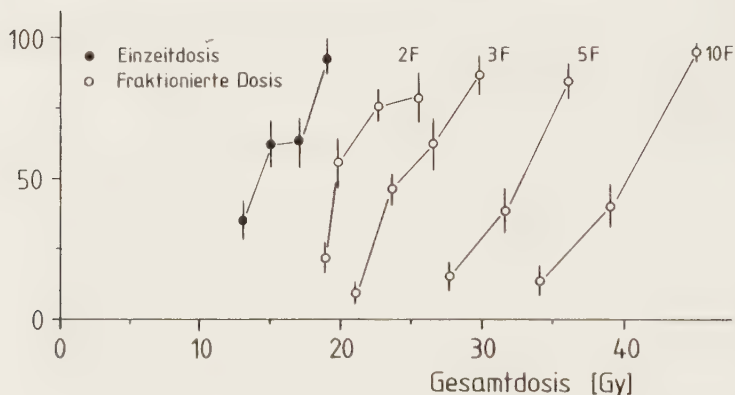


Abb. 37: Dosiseffekte auf die knöcherner Heilung im Bohrlochdefekt in Abhängigkeit von der Dosisfraktionierung bei präoperativer Bestrahlung (für 6 bis 7-wöchige Heilperioden Daten gemeinsam untersucht).

Häufigkeit von Bohrlochdefekten mit $\leq 40\%$ Verschluß

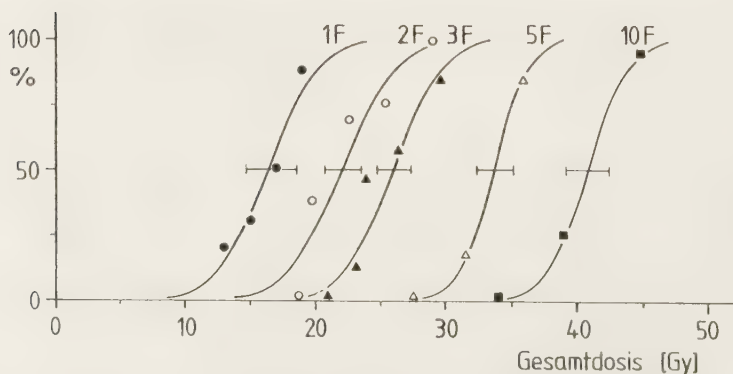


Abb. 38: Abhängigkeit der Knochenheilungsstörung von der Dosisfraktionierung bei präoperativer Bestrahlung. Probitanalyse und Berechnung der $ED_{50/40\%}$ Werte aus den in Fig. 37 dargestellten Rohdaten.

Tab. 17 Durchgeführte Fraktionierungsexperimente: Die Werte für den nicht knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind für die Heilungsperiode von 6 Wochen gemittelt

Anzahl der Fraktionen [n]	Gesamtdosis [Gy]	Anzahl-Knochen [n]	nicht knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	13.0	6	31.8	9.9
"	15.0	6	61.2	11.4
"	17.0	6	50.6	11.6
"	19.0	4	99.6	0.2
2	18.8	6	19.8	6.4
"	19.8	8	56.9	11.0
"	22.6	8	78.4	7.8
"	25.4	8	70.0	15.0
3	21.0	-	--	--
"	23.5	15	47.1	8.0
"	26.4	8	76.2	9.2
"	29.7	6	85.0	11.1
5	27.5	8	7.9	1.2
"	31.5	8	30.6	6.9
"	36.0	7	89.1	4.0
10	34.0	7	18.7	6.6
"	39.0	8	56.7	11.0
"	45.0	8	97.5	0.7

Tab. 18 Durchgeführte Fraktionierungsexperimente: Die Werte für den nicht knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind für die Heilungsperiode von 7 Wochen gemittelt

Anzahl der Fraktionen [n]	Gesamtdosis [Gy]	Anzahl-Knochen [n]	nicht knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	13.0	4	38.3	12.6
"	15.0	4	61.9	8.3
"	17.0	6	75.0	14.4
"	19.0	4	84.0	13.0
2	18.8	6	21.9	7.2
"	19.8	8	52.4	13.7
"	22.6	8	71.2	9.0
"	25.4	8	85.9	9.1
3	21.0	11	9.1	2.8
"	23.5	14	44.7	8.3
"	26.4	8	46.3	14.7
"	29.7	6	87.9	7.6
5	27.5	6	23.1	9.7
"	31.5	8	46.0	11.5
"	36.0	6	76.4	12.4
10	34.0	6	6.8	3.1
"	39.0	8	21.7	5.6
"	45.0	8	89.7	4.5

Tab. 19 Durchgeführte Fraktionierungsexperimente: Die Werte für den nicht knöchern verschlossenen Anteil im Defektvolumen sind für Heilungsperioden von 6 bis 7 Wochen gemittelt

Anzahl der Fraktionen [n]	Gesamtdosis [Gy]	Anzahl-Knochen [n]	nicht knöchern verschlossener Anteil [%]	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	13.0	10	34.4	7.4
"	15.0	10	61.5	7.2
"	17.0	12	62.8	9.5
"	19.0	8	91.8	6.7
2	18.8	12	20.9	4.6
"	19.8	16	54.7	8.5
"	22.6	16	74.8	5.8
"	25.4	16	77.9	8.7
3	21.0	11	9.1	2.8
"	23.5	29	45.9	5.8
"	26.4	16	61.3	9.2
"	29.7	12	86.5	6.4
5	27.5	14	14.4	4.5
"	31.5	16	38.3	6.8
"	36.0	13	83.3	6.1
10	34.0	13	13.2	4.1
"	39.0	16	39.2	7.5
"	45.0	16	93.6	2.4

4. DISKUSSION

4.1 METHODE

Beim Setzen des Bohrlochdefektes wird relativ wenig Weichteilgewebe traumatisiert. Die Heilung erfolgt unter den Bedingungen stabiler Verhältnisse, wie sie unter klinischen Bedingungen nach Marknagelung oder Fixation mittels Platte gefunden wird. Der Eingriff bleibt dennoch relativ einfach und ist auch insofern standardisierbar, als keine Nachbehandlung erforderlich ist. Der Defekt ist vor äußeren Einflüssen durch die abdeckenden Muskeln und die äußere Haut geschützt, und die Defektheilung kann somit unabhängig von solchen ablaufen.

Der Eingriff stellte eine minimale Belastung für die Tiere dar. Spätestens nach 24 Stunden belasteten die Ratten die Hinterextremitäten normal, und die Heilung konnte unter der funktionellen und physiologischen Belastung der Extremität ablaufen.

Eine funktionelle mechanische Belastung der Extremität während der Heildauer hat einen fördernden Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung, sowie auf deren Güte (Sarmiento et al, 1977). Dies hängt nicht zuletzt mit dem Blutfluß im Knochen und dessen Abhängigkeit von der Muskelaktivität zusammen (Geisert, 1958). Zuletzt hat auch das Alter des Betroffenen Einfluß auf den Verlauf der Defektheilung. Tonna und Cronkite (1961 and 1962) konnten mittels Markierungsstudien in der C3H Maus zeigen, daß die Unterschiede in der Frakturheilung in der 18 Monate alten Maus gegenüber der 5 Wochen alten Maus nicht qualitativer sondern rein quantitativer Natur sind.

Der Defekt ist umschrieben und umfaßt ein definiertes Volumen, welches lediglich durch die minimalen Unterschiede in der Kortikalisdicke, die zwischen gleichaltrigen Tieren gefunden werden können, wechselt. Dadurch ist eine exakte Quantifizierung der Strahlenwirkung auf die Knochenheilung möglich. Wenn auch zeit- und arbeitsaufwendig, so ermöglicht sie zudem eine Beurteilung der qualitativen Veränderungen am gleichen Präparat.

In vergleichbaren Untersuchungen von Hayashi und Suit (1971) wurde als Knochendefekt der Femur frakturiert. Wir halten dies nicht für eine gute Methode. Art und Ausmaß der Frakturheilung hängen u.a. von der Art der Fraktur, sowie von ihrer Behandlung ab (Revell, 1986). Fehlende Fixation der Frakturenenden kann zur Bildung von Pseudarthrosen führen. Das Einwachsen von Weichteil- oder Muskelgewebe zwischen die Frakturenenden, bzw. dazwischen liegende Stücke toten Knochens, können die Frakturheilung erheblich verzögern oder auch verhindern.

Die Studien granulierender Wunden der Haut, bzw. im Zahnfach nach Zahnextraktion, entsprechen nur wenig der klinischen Situation der Knochenheilung und erlauben nur eine grobe Quantifizierung der Heilungsmechanismen. Sie sind zudem einer Fülle von äußeren Einflüssen ausgesetzt. So kam es vor allem in den vorbestrahlten Geweben häufig zu Wundinfektionen (Frandsen, 1962; Lawrence et al, 1953). Diese erschwerten die Interpretation der beobachteten Veränderungen zum Teil erheblich.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Bestrahlungsmethode erlaubt eine lokale Bestrahlung der Oberschenkel von 3 - 9 Monate alten Wistar-

ratten unter reproduzierbaren geometrischen Bedingungen. Die Kontrolle der exakten Lage des os femoris im Strahlenkegel ist leicht und schnell durchführbar. Die Behandlungszeiten der Tiere sind kurz. Die Strahlenbelastung sowohl des Abdomens wie auch des kollateralen Beines bestrahlter Tiere liegt unter 0.5% der eingestrahlten Dosis.

4.2

Defektheilung im Knochen

Die Defektheilung im Knochen wird durch die Schädigung von Gefäßen und die Entstehung eines Frakturspaltes, in dem sich ein Blutgerinnsel bildet, in Gang gebracht (Melcher and Irving, 1962). Als Folge der gestörten Zirkulation, sowie direkt durch die äußere Einwirkung des Traumas, kommt es zum Untergang von Bindegewebs-, Fett- und Markzellen (Revell, 1986). Knochensplitter und abgelöste Knochenteile fallen der Nekrose anheim. Bedingt durch den unterbrochenen Blutstrom in den Frakturrenden kommt es zum Absterben der Osteozyten in unmittelbarer Nähe des Frakturspaltes. Nach Collins (1966) werden die ersten leeren Osteozytenlakunen um den 7. Tag nach Frakturierung gesehen, während Rhinelander und Baragry (1962) den hier beschriebenen Befunden entsprechend, solche schon ab dem 4. Tag beobachtete.

Die entzündliche Reaktion ist gekennzeichnet durch die Bildung eines serofibrinösen Exsudates, sowie das Einwandern von zuerst polymorphkernigen Leukozyten und wenig später von Makrophagen (McKibbin, 1978). Sie bestimmt das Bild der Defektheilung im Knochen während der ersten 48 Stunden (Collins, 1966).

Die Organisation des Gerinnsels beginnt 24 Stun-

den nach dem Trauma (McKibbin, 1978). Durch Proliferation von endothelialen und mesenchymalen Zellen dringen sinusoidale Gefäße und Fibroblasten in das Blutgerinnsel ein. Das Fibrin wird durch das Granulationsgewebe innerhalb weniger Tage ersetzt (Little, 1973). Während eine Reihe von Autoren die Ansicht vertritt, daß die fibroblastenähnlichen Zellen hinter den Gefäßen herwandern (Little, 1973), wird diese Annahme von anderen in Zweifel gezogen. So konnten Green et al (1969) nach Cysteamingabe und Bestrahlung eine selektive Schonung der Gefäßreaktion in Tibiafrakturen von Ratten beobachten; die Proliferation mesenchymaler Zellen war jedoch entsprechend einer Vorbestrahlung ohne Cysteamingabe stark gestört.

Das weitere Geschehen während der Defektheilung ist lange Zeit kontrovers diskutiert worden (Ham and Harris, 1971; McKibbin, 1978). Das reparative Granulationsgewebe wird über einen Kallus zu Knochen umgebaut. In Fällen, in denen die Frakturrenden beweglich zueinander sind, sowie in Bereichen lokaler Hypoxie, findet zuerst die Bildung eines äußeren, teils spongiös knöchernen und hauptsächlich knorpeligen Kallus statt (Anderson, 1965; Bassett and Hermann, 1961; Ham and Harris, 1971). Die Bildung neuer Trabekel auf der Oberfläche der Knochenmanschette der Frakturrenden findet um den dritten Tag (Cavadias and Trueta, 1965) immer in unmittelbarer Nähe einsprossender Gefäße statt. Knorpelbildung wurde dagegen immer nur in gefäßlosen Abschnitten des äußeren Kallus in der Umgebung des Frakturspaltes gesehen. Dabei hängen Menge und Ausmaß dieser Kallusbildung von der Beweglichkeit der Frakturrenden zueinander ab (Anderson, 1965; McKibbin, 1978; Pritchard 1972). Nach der knöchernen Überbrückung des Frakturspal-

tes kommt es zur allmählichen Resorption des Kallus. Der externe Kallus dient somit hauptsächlich einer stabilen Fixation der Frakturrenden (Urist et al, 1965).

Der im Bohrlochdefekt im Oberschenkelknochen der Ratte beobachtete Heilmechanismus (Melcher and Irving, 1962) entspricht dem nach stabiler Fixation der Frakturrenden durch Küntscher'sche Marknagelung oder mittels Platte im Hund, Kaninchen und Menschen beschriebenen (Anderson, 1965; Rhineland, 1974; Schenk and Willenegger, 1967). Die periostale Reaktion fehlte völlig oder sie war nur minimal. Richany et al (1965) beobachteten eine periostale Reaktion am nicht frakturierten Knochen hauptsächlich im Bereich chirurgisch traumatisierter Muskelansätze. Übereinstimmend mit Melcher und Irving (1962) war eine solche höchstens auf einer Seite des Bohrlochdefektes zu beobachten und zwar - nach unserer Erfahrung - nahe der Muskelansatzleiste des Trochanter tertius. Knorpelbildung, gefolgt von enchondraler Ossifikation, wurde nur selten und nur in Fällen beschrieben, in denen die Frakturrenden noch geringe Beweglichkeit zueinander hatten (Anderson, 1965; Schenk and Willenegger, 1967; Rhineland and Baragry, 1962).

Übereinstimmend mit Tonna und Cronkite (1961), sowie Rhineland und Baragry (1962) konnten wir die ersten Trabekel eines unreifen, knöchernen Kallus am 4. Tag nach Traumatisierung im Mark und entlang der Wand des Defektzylinders in unmittelbarer Gesellschaft aus dem Mark einsprossender Gefäße finden. Markierungsstudien von Tannock und Hayashi (1972), bzw. Tonna und Cronkite (1962) am langen Röhrenknochen der Maus, zeigten eine deutliche zeitliche Übereinstimmung der proliferati-

ven Antwort des Gefäßsystems und der osteoblastischen Proliferation im Anschluß an eine Fraktur.

Die primäre Ossifikation geht somit direkt aus dem medullären, das Frakturhämatom organisierenden Gefäß- und Bindegewebsstroma hervor (Dickson, 1982; Little, 1973; Trueta, 1963). Der primäre Kallus (Schebitz et al, 1975) besteht aus untereinander anastomosierenden, unregelmäßig angeordneten, feinen Trabekeln eines unreifen Knochens. Er findet wenig später Anschluß an Endost und Periost und verschließt schließlich den Defekt nach außen hin.

Nach Mc Kibbin (1978) stellt die primäre Kallusantwort ein einmaliges Phänomen von nur begrenzter Dauer dar. Übereinstimmend mit dem von Sarmiento et al (1977) beschriebenen Heilungsverlauf immobilisierter Frakturen im Rattenknochen, war diese nach etwa 2 Wochen abgeschlossen. Mit Beginn der dritten Woche war der medulläre Kallus weitgehend resorbiert. Mit fortschreitender Heilung wurden die feinen Trabekel dieses als primär bezeichneten Kallus durch osteoklastische Aktivität abgebaut und nach dem Einsprossen von Gefäßen und unter endostaler Beteiligung durch breite, kompakte Trabekel eines sekundären Kallus ersetzt (Melcher and Irving, 1962). Während der fünften und sechsten Woche reifte dieser sekundäre Kallus weiter aus; gleichzeitig fand vermehrt Resorption eines überschüssig gebildeten periostalen Kallus statt. Der Prozess der Remodellierung verlief daher langsamer als die frühe Phase der Frakturheilung. Diese von Sarmiento et al (1977) im Humerus der Ratte und von Anderson (1965) im Femurknochen des Hundes beschriebenen Vorgänge stimmen mit den eigenen Beobachtungen überein.

Es wird bis heute kontrovers darüber diskutiert, ob der Osteoblast aus einer ortsansässigen teilungsfähigen Zelle mit gerichteter Entwicklung, einer sogenannten committed stem cell, oder aus einer pluripotenten Zelle mit mesenchymalem Charakter hervorgeht. Eine ausführliche Übersicht über die Literatur zu diesem Thema findet sich bei Owen (1983). Man nimmt heute meist an (Chalmers et al, 1975; Friedenstein, 1976), daß die Osteoprogenitorzellen durch Proliferation und Migration pluripotenter Zellen von Periost (Tonna et al, 1961 und 1962), Knochenmarkstroma (Dickson, 1982) und anderen Bindegeweben in Abhängigkeit von lokalen Bedingungen hervorgehen und sich anschließend zu Knochenbildnern differenzieren (Owen, 1970; Thielemann et al, 1982). Auch die Fähigkeit der heterotopen Knochenbildung in den verschiedenen Organen, wie vordere Augenkammer der Ratte (Urist and McLean, 1952), Muskelgewebe oder Blasenschleimhaut, deuten auf das Vorhandensein einer pluripotenten Zelle hin, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, Knochenbildungszellen hervorzubringen (Chalmers et al, 1975).

Während Arnold und Jee (1957) noch die Ansicht vertraten, der Osteoklast ginge durch die Fusion von Osteoblasten und/oder Makrophagen hervor, ist nach Ash et al (1980) nur mehr der im Blut zirkulierende Monozyt der direkte Vorläufer des Gewebemakrophagen und möglicherweise des vielkernigen Osteoklasten. Nach Burger et al (1982) sind es jedoch nur die unreifen, mononuklearen Phagozyten, welche zur Bildung von Osteoklasten induziert werden können (Chambers, 1982). Es erscheint zumindest erwiesen, daß der Osteoklast von hämopoietischen Stammzellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie abstammt (Nijweide, 1987; Osdoby, 1987).

Die Mechanismen sowie der zeitliche Verlauf der Heilung von kutanen und abdominalen Wunden sind weitgehend identisch mit jenen der Defektheilung im Knochen. Auf eine initiale, entzündliche Reaktion folgt unmittelbar eine proliferative Phase mit Maximum während dem 1.-5. Tag (Van den Brenk, 1974). Diese ist gekennzeichnet durch Proliferation von mesenchymalen und endothelialen Zellen. Die Entwicklung eines Reparaturblastems (primärer Kallus im Knochendefekt bzw. Granulationsgewebe im Laufe der Wundheilung) hängt folglich von der proliferativen Aktivität des ortsansässigen Gefäßbindegewebes ab (McLean, 1968; Owen, 1980; Rohrer et al, 1979). Der Wiedergewinn einer funktionellen Integrität hängt zudem maßgeblich von Differenzierungsvorgängen und der folgenden Matrixsynthese ab.

4.3

Strahleninduzierte Schädigung des intakten adulten Knochens

Knochen stellt ein kompaktes, stabiles und dennoch dynamisches Gebilde dar. Seine inneren und äußeren Oberflächen (Havers'sche Kanäle, Endost und Periost) sind von umbauaktiven Knochenzellen und reaktivem Gefäßbindegewebe überzogen. Während des Wachstums ist jugendlicher Knochen durch eine hohe Aktivität anaboler bzw. kataboler Prozesse gekennzeichnet. Entsprechend läßt sich nach Bestrahlung, in Abhängigkeit von regionalen Unterschieden in der Umbauaktivität und der Zellproliferation (Kummermehr, 1973) unterschiedlich früh, eine dosiabhängige Störung in der Chondrogenese der Wachstumsfuge, sowie der Osteogenese in der proximalen Metaphyse, dem Ort der primären Verknöcherung, aber auch in Epi- und Diaphyse beob-

achten (Kember, 1967; Kummermehr, 1973). Bestrahlung im Kindesalter führte in den mit über 20 Gy exponierten Knochen zum Teil zu erheblichen regressiven Veränderungen (Gössner et al, 1985; Rubin and Casarett, 1968 [a]).

Auch im ausgewachsenen reifen Knochen können zeitlebens Umbauvorgänge beobachtet werden, welche einerseits der Regulierung des Mineralhaushaltes, andererseits einer Anpassung des Stützgerüsts auch an geringfügige Veränderungen in der funktionellen Beanspruchung dienen. Dennoch ist im unstimulierten Knochen der Zellumsatz relativ niedrig mit einer Turn-over-Zeit von etwa 2 Monaten (Tannock and Hayashi, 1972; Tonna and Cronkite, 1968). Die entsprechend geringe Proliferationsrate mit einem Thymidin-Markierungsindex von 0.3% würde erwarten lassen, daß die Zellen entsprechend langsam regressiven Veränderungen im Anschluß an die Bestrahlung anheimfallen. Dies wiederum könnte eine Erklärung für die Tatsache sein, daß sich Strahlenschäden im Knochen Erwachsener im allgemeinen erst nach Latenzphasen von bis zu Jahren manifestieren (Patt and Quastler, 1963).

Obwohl sich eine Fülle von experimentellen und klinischen Untersuchungen mit dem Problem der Strahlenwirkung auf Knochengewebe befaßt hat, besteht weiterhin große Unklarheit über die Pathogenese der strahleninduzierten Veränderungen.

Die pathophysiologischen Veränderungen in bestrahltem Knochen sind gekennzeichnet durch Atrophie und Fibrose der Knochenhaut (Rohrer et al, 1979; Silverman and Chierici, 1965) und einen Schwund der Osteoblasten (Howland et al, 1975; Sams, 1966). Eine gestörte Mikrozirkulation mit

Abnahme der Gefäßdichte in Mark und kompaktem Knochen ist Ausdruck regressiver Gefäßveränderungen (King et al, 1983; Pitkänen and Hietanen, 1984). Während Fibrose und fettige Degeneration des Markes relativ früh beobachtet werden können (Beumer et al, 1979; Knospe et al, 1966), werden Osteoporose und -fibrose erst nach einigen Monaten und Jahren gesehen (Murray et al, 1980 [a]; Sengupta and Prathap, 1973).

Während Knochenanbau und Knochenabbau sich im Erwachsenen unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht befinden, erscheint dieses im Anschluß an Bestrahlung nachweislich gestört (Beumer et al, 1979). Eine Abnahme der osteoblastischen Aktivität bedingt eine Verminderung der Kollagenbildung. Eine reduzierte Knochenmatrixbildung bei normaler bzw. erhöhter Knochenresorption führt zum klinischen Bild der Osteopenie, röntgenologisch an der Abnahme der Knochendichte zu erkennen (Ergün and Howland, 1980; Sengupta and Prathap, 1973). Gelegentlich werden auch sklerotische Areale gefunden als Ausdruck eines frustrierten Reparaturversuches (Kenzora et al, 1978).

Für eine Reihe von Geweben scheint die hervorragende Bedeutung von strahlenbedingten Gefäßveränderungen wie End- und Periarteriitis, Thrombose und Nekrose, sowie eine gestörte Mikrozirkulation mit Abnahme der Kapillardichte bei der Entwicklung von Spätschäden nachgewiesen (Hopewell and Young, 1978; Lauk et al, 1987; Law, 1981; Reinhold, 1980; Ullrich and Casarett, 1977). Entsprechend diskutieren eine Reihe von Untersuchern die Strahlenschädigung von Knochen als avaskuläre Radionekrose (King et al, 1983; Pitkänen and Hopewell, 1983; Rubin and Casarett, 1968 [b]). Andere

hingegen sahen sich durch die nach hohen Strahlendosen im Oberschenkelknochen von adulten Meer-schweinchen bzw. im Kieferknochen von Rhesusaffen beobachteten histologischen Veränderungen veranlaßt, diese als Folge einer direkten Schädigung kritischer Zellen des Knochengewebes anzusehen (Gowgiel, 1960; Grimm, 1969; Überschar, 1959). Eine Reihe von Studien deuten jedoch darauf hin, daß die pathophysiologischen Veränderungen im Knochen sowohl als Folge einer direkten Schädigung von Knochenzellen bzw. deren Vorläufer, als auch der gestörten Mikrozirkulation zu verstehen sind.

Nach einer initialen entzündlichen Hyperämie unmittelbar im Anschluß an die Bestrahlung, wurde eine vorübergehende Regeneration mit weitgehender Wiederherstellung der Sinusoidarchitektur und Normalisierung der Blutvolumenwerte und, einheitlich ab der 4 Woche, eine verminderte Gefäßdichte beobachtet (Gong et al, 1969; King et al, 1983; Knospe et al, 1966). Übereinstimmend wurde ein rascher Schwund der Osteoblasten im Anschluß an die Bestrahlung (20 Gy einer 200 bzw. 250 kV Röntgenstrahlung) beobachtet. Am Kniegelenk der Maus (Woodard, 1957), der Tibia der Ratte (Cohn, 1961) und in langen Röhrenknochen von Hunden (Finston et al, 1966) erfolgte ein rascher Abfall der alkalischen Phosphatase auf ein dosisabhängiges Minimum innerhalb der ersten 10 bis 14 Tage nach Bestrahlung mit 8 - 26 Gy. Diesem folgte eine Abnahme des Mineraleinbaues im Knochen und der Retention von knochensuchenden Radionukliden (^{32}P , ^{45}Ca und ^{89}Sr) auf ein Minimum etwa um den 21. Tag (Babicky and Kolar, 1966; Cohn, 1961; Wilson, 1956). Lediglich Kummermehr (1973) konnte eine vorübergehende Erholung des ^{45}Ca -Einbaues in der 2 Woche beobachten.

Die Reduktion der Gefäßdichte war in Mark und Kortikalis der Rattentibia dosisabhängig und erreichte ihr Maximum 3 Monate nach Strahlenexposition (Cutright and Brady, 1971; Pitkänen and Hopewell, 1983). Ebenso erschien die Perfusion der Tibia im Kaninchen im gleichen Zeitraum nach Bestrahlung vermindert; gleichzeitig war die Remodellierungsaktivität im Knochen erheblich erhöht, wobei Osteoklasie das histologische Bild prägte (King et al, 1983). Entsprechend wurde 4 Monate später eine dosisabhängige Zunahme porotischer Veränderungen festgestellt (Cutright and Brady, 1971; Pitkänen and Hietanen, 1984). Ebenso wie der Prozeß der Mineralisation war nachweislich auch jener des Knochenabbaus nach Dosen von 20 Gy und darüber reduziert (Anderson et al, 1979; Finston et al, 1966; Kummermehr, 1973).

Vitaler Knochen besitzt zeitlebens die Fähigkeit, auf einen entsprechenden Reiz, wie Trauma oder Fraktur, mit einem heftigen Proliferationsschub osteoblastischen Gewebes und von Kapillarendothelzellen zu reagieren. Der Anstieg in der Remodellierungsaktivität kann situationsbedingt von Knochenanbau bzw. Knochenabbau dominiert werden, oder die beiden Prozesse halten sich die Waage.

Die regenerative Kapazität des Gefäß- und mesenchymalen Bindegewebes bestrahlten reifen Knochens, aber auch anderer Gewebe, wie zum Beispiel der Leder- und Unterhaut, kann z. T. erheblich gestört sein, ohne daß dies klinische Konsequenzen haben muß. Faktoren wie Trauma oder Infektion können jedoch die Strahlenschädigung zum Ausdruck kommen lassen.

Als Folge einer Mitbestrahlung reifen Knochens im Laufe einer Strahlenbehandlung im erwachsenen Pa-

tienten wurden nicht selten - in Abhängigkeit von der funktionellen Belastung des betroffenen Knochens, sowie von äußeren Einflüssen - pathologische Frakturen und Osteomyelitiden beobachtet, welche - wenn überhaupt - dann nur langsame Regeneration erkennen ließen (Bragg et al, 1970; Dalinka et al, 1974; Ewing, 1926; Murray et al, 1980 [b]). Im Hund und im Affen wurden im Anschluß an Bestrahlung häufig ulzerative Gingivitiden und Osteomyelitiden beobachtet (Chambers et al, 1958, Gowgiel, 1960). Auch im Kaninchen und in der Ratte prägten Sequesterbildung und Osteomyelitis häufig das klinische Bild (Frandsen, 1962). Die Reepithelisierung und das Abheilen des Defektes blieben weitgehend aus oder waren erheblich verzögert.

Eine häufige Folge der Mitbestrahlung äußerer Haut sind die strahleninduzierte Atrophie und Fibrose von Leder- und Unterhaut (Overgaard et al, 1987; Trott and Kummermehr, 1985; Turesson et al, 1984 [a] und [b]). Sie können - gleich dem Geschehen im Knochen - im Patienten oft jahrelang symptomlos bleiben. Im Anschluß an äußere Noxen, wie intensive Sonnenbestrahlung bzw. Trauma, entwickeln sich häufig Ulzera mit äußerst schlechter Heiltendenz (Rudolph, 1982; Trott and Kummermehr, 1985). Offensichtlich ist die Regenerationsfähigkeit des derart strahlengeschädigten Gewebes zum Teil erheblich gestört. So zeigten experimentell mit Eitererregern kontaminierte Schnittwunden in der lokal vorbestrahlten Haut von Ratten eine dosisabhängige Zunahme in der Infektionsrate (Ariyan et al, 1980). Plastische Chirurgen kennen seit langem das Problem, bestrahlte Haut zum Heilen bzw. Hauttransplantate in vorbestrahltem Gebiet zum Einheilen zu bringen (Robinson, 1975; Wiernik et al, 1974). Masters und Robinson (1961) fanden

in 169 Patienten eine Komplikationsrate von 39%.

4.4.1 Pathohistologische und -physiologische Befunde als Folge einer strahleninduzierten Heilungsstörung im ausgewachsenen Knochen

Zweck dieser Studie war es, ein Modell zu entwickeln, welches die quantitative Bewertung der Dosiswirkung auf die Regenerationsfähigkeit im Knochen unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen erlaubt.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, daß Vorbestrahlung mit Einzeitdosen bis zu 13 Gy einer 320 kV Röntgenstrahlung 24 Stunden bis 6 Monate vor Setzen des Bohrlochdefektes letztendlich keine nachteilige Wirkung auf die Defektheilung hatte. Die Reparaturmechanismen setzten mit einer Verzögerung von etwa einer Woche ein, der Verlauf der Heilung entsprach ab der 3. Woche jedoch weitgehend dem in den Kontrolltieren beobachteten. Die Heilung verlief ab der 4. Woche schneller als in der Kontrolle, und der knöchern verschlossene Volumenanteil im Bohrlochdefekt lag immer deutlich über den Kontrollen.

Dieser Befund wird von einer Reihe von Untersuchungen bestätigt. Bestrahlung mit 750 R verzögerte den initialen Anstieg in der Hydroxyprolinbildung im Wundgebiet. Die Gesamtproduktion von Hydroxyprolin, und somit die Menge neugebildeten Kollagens, war während der ersten drei Wochen in den bestrahlten Tieren deutlich größer als in den Kontrollen (Archer et al, 1970). Auch war die Zugfestigkeit der mit 3 Gy vorbestrahlten Schnittwunden ab dem 20. Tag deutlich größer als in den Kontrollen (Dobbs, 1939). Beschleunigte

Wundheilung nach niedrigen Strahlendosen war schon früher von einer Reihe von Autoren festgestellt worden und findet sich bei Dobbs (1939) ausführlich diskutiert.

Eine mit der Zeit zunehmende Erholung der Wundheilungsmechanismen wurde von Jacobsson et al (1986) in der vorbestrahlten Kaninchentibia beobachtet. Mittels einer in die Kortikalis eingebauten Knochenkammer konnte nachgewiesen werden, daß die Menge neugebildeten Knochens nach vier Wochen dosisabhängig vermindert war. Bei wiederholter Entnahme konnte in der mittleren Dosisgruppe von 15 Gy eine Zunahme der Menge des innerhalb von drei Wochen neugebildeten Knochens beobachtet werden, nicht jedoch nach hohen Dosen. Rudolph (1982) beobachtete nach wiederholten chirurgischen Eingriffen in bestrahltem Gewebe eine zunehmend bessere Wundheilung, als ob die Wunde zunehmend zur Granulationsgewebsbildung stimuliert worden wäre.

Die Befunde einer vollständigen bzw. partiellen Restitution der Mikrozirkulation der Rattentibia 6 Monate nach Bestrahlung mit therapeutischen Dosen (King et al, 1983; Knospe et al, 1966; Pitkänen and Hopewell, 1983), sowie einer Erholung der osteoblastischen Aktivität (King et al, 1983; Woodard, 1970) stimmen mit diesen Beobachtungen gut überein. Bei Bestrahlung mit hohen Einzeildosen von etwa 30 Gy konnte hingegen bis zum 8. Monat keine Erholung der Mikrozirkulation im Mark und im kompakten Knochen gefunden werden (Cutright and Brady, 1971; Knospe et al, 1966).

In unseren Untersuchungen führte die Vorbestrahlung mit Einzeildosen von über 14 Gy zu einer Reduktion der initialen entzündlichen Reaktion. Die

frühe proliferative Phase, physiologischerweise charakterisiert durch rasche Proliferation mesenchymaler Zellen und das Einsprossen von Kapillaren, war dosisabhängig verzögert und vermindert. Während bei Vorbestrahlung mit 15 Gy eine initiale Knochenentwicklung frühestens ab der 3. Woche gefunden wurde, und der Umbau zu reifem lamellären Knochen verzögert war, so zeigte sich dennoch das Geschehen mit Erreichen von Kontrollwerten bis spätestens zur 10. Woche abgeschlossen. Nach Einzeildosen von 19 Gy und darüber erschienen die Heilmeehanismen sehr stark gestört; sowohl anabole wie auch katabole Prozesse waren offensichtlich gleichermaßen und mit höheren Dosen zunehmend betroffen. Dennoch konnte nach 19 Gy eine allmähliche Erholung zwischen der 16. und 32. Woche beobachtet werden, welche durch die Apposition eines vitalen lamellären Knochens gekennzeichnet war. Nach 22 Gy hatte neugebildeter Knochen ein atypisches faseriges und unreifes Aussehen; meist erschien er avital, wobei ein Osteoblastensaum weitgehend fehlte. Bei dieser Dosis konnten keine Anzeichen für eine späte Erholung gefunden werden.

Nach unseren Untersuchungen waren das Reparaturvermögen des Gefäß- und Bindegewebes und somit der knöcherne Verschluss eines Bohrlochdefektes im Rattenfemur dosisabhängig reduziert. Eine Einzeldosis von 16.7 Gy, 24 Stunden vor Setzen des Traumas eingestrahlt, verringerte die Menge neugebildeten Knochens auf mindestens 40% des Defektvolumens, d. h. auf etwa 50% der Kontrolle, in der Hälfte der Tiere. Die teilweise Erholung zu späteren Zeitpunkten nach langen Heilperioden spiegelt sich in der Zunahme der isoeffektiven Dosis um ca. 2.5 Gy auf 19.4 Gy und in einer Zunahme der Steilheit der Kurve wieder.

Eine Reihe von Studien hat sich mit der Pathophysiologie der strahleninduzierten Störung der Fraktur- bzw. Wundheilung beschäftigt. Schon 1910 hatte Cluzet beobachtet, daß in den mit hohen therapeutischen Strahlendosen vorbestrahlten langen Röhrenknochen von Hunden und Kaninchen die Frakturheilung gestört war. Nach Vorbestrahlung der Kaninchentibia mit mittleren Dosen einer 200 kV-Röntgenstrahlung fehlte selbst 12 Wochen nach Frakturierung eine knöcherne Konsolidierung der Fraktur weitgehend (Regen and Wilkins, 1936). Gleichzeitig war der Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase, wie er im unbestrahlten Frakturbereich beobachtet wurde, wesentlich reduziert. Die Bestrahlung der Tibia der Maus vor Frakturierung führte zu einer Verzögerung der Aktivierung und insgesamt zu einer Abnahme der Reparaturprozesse (Regen and Wilkins, 1936; Woodard, 1970). Der Anstieg der alkalischen Phosphatase war ebenso wie die ^{89}Sr -Retention verzögert und vermindert. Als Ergebnis der gestörten Remodellierung und der verminderten Kallusantwort war die funktionelle Heilung gestört und häufig noch nach 16 Wochen unvollständig (Bonarigo and Rubin, 1967).

Untersuchungen im frakturierten Unterarmknochen der Maus zeigten eine dosisabhängige Störung der Heilmechanismen (Cooley and Goss, 1958). Nach Einzeitdosen von 10 Gy verlief die Heilung normal, der Ablauf war jedoch um etwa eine Woche verzögert. Nach 20 Gy war die Organisation des Blutgerinnsels gestört. Erst in der 4. Woche konnte die Bildung eines knorpeligen Kallus beobachtet werden. Nach höheren Dosen wurde der Frakturspalt bis zur 6. Woche lediglich von lockerem Bindegewebe ausgefüllt.

Albrektsson et al (1980) und Jacobsson et al (1985) beobachteten eine Reduktion der regenerativen Kapazität in der bestrahlten Kaninchentibia. Die Menge des in einer Knochenkammer neugebildeten Knochens zeigte sich in der 4. Woche dosisabhängig vermindert. Neugebildeter Knochen erschien immer unreifer, weniger organisiert und mehr fibrös als in der Kontrolle. Die Regeneration setzte zudem mit höheren Dosen zunehmend später ein (Jacobsson et al, 1986). Es konnten jedoch nur minimale Gefäßveränderungen gefunden werden.

Bei Nachbestrahlung mit fraktionierten Strahledosen bis 60 Gy war die primäre Kallusbildung im Bohrlochdefekt im langen Röhrenknochen des Beaglehundes in Abhängigkeit von der Strahlendosis zunehmend vermindert (Schlegel et al, 1972). In der hohen Dosisgruppe konnten in der 8. Woche nur ganz vereinzelt randständiges Osteoid und beginnende Mineralisation beobachtet werden. Der Defekt war mit locker strukturiertem, zell- und gefäßarmem Bindegewebe ausgefüllt.

Während Vorbestrahlung mit 10 Gy weder im harten Gaumen nach Setzen einer Stanzwunde (Kahnberg and Thilander, 1987), noch im Kiefer der Ratte nach Zahnextraktion (Frandsen, 1962) einen signifikanten Einfluß auf die Heilung ausübte, führten Dosen von 17 Gy und darüber zu einer zunehmenden Verzögerung und Verminderung der zellulären entzündlichen Reaktion, der Organisation des Fibringerinnsels und der Knochenneubildung. Die Reepithelisierung des Defektes mit Mundschleimhaut zeigte sich ebenfalls verzögert oder blieb aus. Im Kaninchenkiefer verursachte Vorbestrahlung mit fraktionierten Dosen (20 Gy und darüber) eine zunehmende Hemmung der Kallusbildung, und auch das

Einheilen autologer Knochentransplantate in mandibuläre Defekte war dosisabhängig gestört (Nathanson, 1977).

Schon 1934 hatte Nathanson eine verzögerte Wundheilung in der Haut von Hunden nach Dosen von 1000 R beobachtet. Niedrigere Dosen zeigten keinen Effekt. Dobbs (1939) konnte nach Strahlendosen über 10 Gy nur geringe Zellproliferation, sowie eine Reduktion sprossender Kapillaren im Vergleich zu unbestrahlten Hautwunden in der Ratte beobachten. Nach mittleren therapeutischen Dosen stellte Grillo (1963) eine Verminderung der mononuklearen Zellen im Wundgebiet sowie der Proliferation von Fibroblasten und Kapillarendothelzellen mittels Autoradiographie fest.

Dotto et al (1970) beobachteten eine Reduktion der Gefäßproliferation in der initialen Phase der Wundheilung nach hohen Strahlendosen. Moore (1984) beobachtete eine Verminderung der Kapillarsprossung im bestrahlten Wundgebiet, eine Abnahme der Fibroblastenproliferation und eine verminderte Kollagenbildung und Reifung. Die beobachtete Wundheilungsstörung erfolgte dosisabhängig nach Vorbestrahlung mit Dosen von 10 Gy und mehr.

Nach Vorbestrahlung mit 20 Gy Einzeitdosen war das Verheilen von Gefäßanastomosen gestört (Ariyan et al, 1980). Mikrothrombenbildung wurde in 2% der unbestrahlten und in 20% der bestrahlten Anastomosen der Arteria carotis beobachtet. Die Proliferation endothelialer bzw. mesenchymaler Zellen zur Abdeckung des Defektes war in den bestrahlten Tieren gegenüber der Kontrolle z. T. erheblich gestört. Gilette et al (1975) beobachteten im Auge von Hunden als Folge einer Keratek-

tomie Gefäßneubildung, und diese fehlte in Abhängigkeit von der Dosis in einer zunehmenden Fraktion der vorbestrahlten Tiere.

Schmid (1958) führte die deutlich verzögernde Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Wundheilung bei Vorbestrahlung auf die gestörte Teilungsfähigkeit des Reparaturgewebes zurück. Van den Brenk et al (1974) konnten in vorbestrahlten Wunden eine dosisabhängige Abnahme der Zellproliferation und der Gesamtzelldichte im Wundgebiet feststellen, während gleichzeitig die in den Kontrollen beobachtete Zunahme der Kapillardichte weitgehend fehlte. Nach hohen therapeutischen Dosen fehlte das Granulationsgewebe weitgehend. Damit einhergehend waren die Kollagenneubildung und entsprechend auch die Wundkontraktion gegenüber unbestrahlten Wunden dosisabhängig reduziert (Grillo and Potsaid, 1961).

Eine Reihe von experimentellen Arbeiten untersuchten die Dosisabhängigkeit einer Reduktion der regenerativen Kapazität und funktionellen Heilung in bestrahlten Geweben wie Knochen oder Haut.

Eine röntgenologische Studie der Kallusbildung im frakturierten Femur der Maus ergab im Anschluß an eine Vorbestrahlung mit Einzeitdosen von 10 bis 21 Gy eine dosisabhängige zeitliche Verzögerung, sowie absolute Verminderung der kallogenen Reaktion. 17.5 Gy, 24 Stunden vor Frakturierung eingestrahlt, reduzierten das maximale Kallusvolumen in der Hälfte der Tiere auf weniger als 30% gegenüber der Kontrolle (Hayashi and Suit, 1971).

Bei Vorbestrahlung mit fraktionierten Gesamtdosen von 43.5 Gy war die Biegestabilität der Ulna im Kaninchen 8 Wochen nach Frakturierung auf 37%

der Kontrolle reduziert (Datta, 1983). Der gleiche Effekt wurde bei Nachbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 64 Gy erzielt. Nachbestrahlung von Femurfrakturen in der Ratte mit 25 Gy in 10 Fraktionen reduzierte die Torsionsstabilität auf 30% der Kontrolle nach 16 Wochen Heilperiode (Pelker et al, 1984).

Devereux et al (1980) konnten in der mit 20 Gy vorbestrahlten Haut der Ratte eine Reduktion der Wundfestigkeit etwa auf die Hälfte der Kontrolle am 14. Tag und auf ein Drittel am 21. Tag beobachten; entsprechend war die Kollagensynthese, gemessen am Gehalt an hydroxyliertem ³H-Prolin im Wundgebiet, bis zum 21. Tag reduziert im Gegensatz zu unbestrahlten Kontrollwunden. Eine dosisabhängige Abnahme der Kollagenproduktion konnte auch von Archer et al (1970) ebenfalls in der Ratte verfolgt werden. Zwölf Tage nach Setzen einer Wunde in der fraktioniert vorbestrahlten Haut des Schweines war die Menge an neugebildetem Kollagen gegenüber der Kontrolle reduziert. Im Kaninchen führte eine identische Behandlung zu einer Reduktion der Wundfestigkeit (Thompson and Bennett, 1970). Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit älteren Untersuchungen über die Entwicklung der Wundfestigkeit nach Ganzkörperbestrahlung (Stajic and Milovanovic, 1970) bzw. lokaler Vorbestrahlung (Dobbs, 1939).

Gorodetsky et al (1987) verwendeten die Entwicklung der Wundfestigkeit in Schnittwunden in der Rückenhaut der Ratte. Vorbestrahlung mit Einzeldosen zwischen 8 und 20 Gy resultierte in einer dosisabhängigen Reduktion der Wundfestigkeit am 14. Tag bis auf 75% der in unbestrahlten Wunden gemessenen. Eine weitere Erhöhung der Dosis bis auf 27 Gy zeigte keine weitere Zunahme im Effekt.

4.4.2

Der Einfluß des Intervalls zwischen Bestrahlung und Trauma auf die Dosisabhängigkeit der Heilungsstörung

Wie in 4.3. besprochen, deutet eine Reihe von Studien darauf hin, daß Zusammenhänge zwischen der Erholung von Knochenmarkschaden, Gefäßschaden und der Strahlenschädigung kompakten Knochens existieren, deren exakte Natur jedoch noch nicht untersucht worden ist (Maloney and Patt, 1972; Patt and Maloney, 1970). Ebenso wurden in der Haut des kleinen Nagers (Patterson et al, 1972; Wiernik et al, 1974) und des Schweines (Young and Hopewell, 1982) zeitabhängige Veränderungen und eine Erholung in der Vaskularisation zwischen dem 3. und 12. Monat im Anschluß an Bestrahlung beschrieben.

Die von uns nach Einzeitdosen von 15 Gy und mehr im Mark beobachteten histologischen Veränderungen stimmen gut mit den an intakten adulten Knochen im Anschluß an Bestrahlung erhobenen Befunde überein. So konnten wir im Anschluß an eine initiale Hämorrhagie und Zelldepression und eine vorübergehende Erholung am 4. Tag zu späteren Zeitpunkten zum Teil erhebliche regressive Veränderungen bis hin zur Markfibrose finden. Auch entspricht die in den hohen Dosisgruppen mit zunehmendem Intervall zwischen Bestrahlung und Traumatisierung beobachtete reduzierte Blutung aus dem Bohrloch der, von King et al (1983) und anderen beschriebenen, Störung in der Mikrozirkulation von Mark und Knochen. Auch fanden wir eine partielle Erholung der Reparaturprozesse zwischen der 16. und 32. Woche nach Vorbestrahlung mit Einzeitdosen bis zu 19 Gy und einem Intervall von 24 Stunden. Dennoch hatte eine Verlängerung des Intervalles zwischen Bestrahlung und Setzen des

Defektes keinen signifikanten Einfluß auf die Dosisabhängigkeit der Heilungsstörung.

Morse et al (1974) beobachteten eine dosisabhängige Reduktion der, durch die Gabe von Östrogenen induzierten, endostalen Knochenzubildung nach Strahlendosen von 9 - 22 Gy. Dieser Effekt zeigte sich weitgehend unabhängig vom zeitlichen Abstand der Vorbestrahlung zur Stimulierung der Osteoneogenese.

Patterson et al (1972) und Wiernik et al (1974) untersuchten die Strahlenwirkung auf die Regenerationsfähigkeit bestrahlter Haut in der Ratte anhand des Überlebens von gestielten Hautlappen. Obgleich zeitabhängig zum Teil erhebliche Veränderungen in der Blutversorgung von Mark und Knochen im Anschluß an die Bestrahlung beobachtet wurden - mit maximaler Reduktion nach 12 Wochen und weitgehender Normalisierung bis zum 12. Monat - konnte zu keinem Zeitpunkt nach Bestrahlung ein Unterschied in der Dosiswirkung auf das Überleben der Allotransplantate gefunden werden.

In der mit Einzeildosen zwischen 8 und 20 Gy vorbestrahlten Haut der Ratte wurde eine dosisabhängige Reduktion der Wundfestigkeit am 14. Tag beobachtet, und diese war unabhängig vom zeitlichen Abstand zur Vorbestrahlung; untersucht wurden Intervalle von einer Stunde bis zu 65 Tagen (Gorodetsky et al, 1987). Auch Dobbs (1939) und Lawrence et al (1953) fanden die Dosisabhängigkeit der Heilungsstörung nicht signifikant verändert bei unterschiedlichem Intervall zwischen Bestrahlung und Wundsetzen.

Obgleich die Ergebnisse von Hayashi und Suit (1971) zuweilen dahingehend interpretiert wurden,

sie hätten am Modell der Frakturheilung im Mäusefemur eine Art slow repair (Field et al, 1976) beobachtet, so waren die von ihnen zu den untersuchten Intervallen beobachteten Unterschiede in der Dosiswirkung unserer Ansicht nach nicht signifikant. Weiterhin schließen die Untersuchungen eine Repopulierung von Seiten der Chondrozyten des knorpeligen Frakturkallus nicht aus.

Field et al (1976) beschrieben in der Mäuselunge eine langsame Erholung von Strahlenschaden, die sie als "slow repair" bezeichneten. Es sollte sich hierbei ebenso wie bei der von Elkind und Sutton (1959) erstmals beschriebenen Erholung subletalen Strahlenschadens um eine intrazelluläre Reparatur subeffektiver Strahlenschäden handeln, jedoch um den Faktor 100 mal langsamer ablaufend.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß Mechanismen wie Regeneration durch Repopulierung, wie sie in Mausergeweben mit hohem Zellumsatz (Epidermis, Schleimhaut des Magendarmtraktes u. a.) beobachtet werden, sowie "slow repair" in einem Zeitraum bis 6 Monate nach Bestrahlung im Knochen keine bedeutende Rolle spielen.

4.5. Der Effekt der Fraktionierung auf die strahleninduzierte Heilungsstörung im Knochen

Viele Strahlenwirkungen beruhen auf der Fähigkeit ionisierender Strahlen, die unbegrenzte Teilungsfähigkeit sogenannter klonogener Zellen irreversibel zu hemmen. So haben die Stammzellen von Mausergeweben - wie Epidermis oder der zellulären Elemente im Blut - die Funktion, den physiologischen Zellverlust durch Reproduktion gewebsspezi-

fischer Zellen auszugleichen. Eine vergleichbare Funktion besitzen die pluripotenten mesenchymalen Zellen des Gefäßbindegewebes, deren Nachkommen sich - im Anschluß an eine gerichtete Differenzierung - als Fibroblasten, Osteoblasten und möglicherweise als Endothelzellen maßgeblich unter anderem an Regenerationsprozessen beteiligen. Die Reduktion der Fraktion von Zellen mit Stammzellcharakter pro Gewebeeinheit führt, in Abhängigkeit von der eingestrahlten Dosis, zu mehr oder minder schweren pathophysiologischen Veränderungen an dem bestrahlten Gewebe.

Die Reduktion der Zahl überlebender Säugerzellen nach Strahlendosen von 2 Gy und darüber folgt etwa einer exponentiellen Funktion. Im niedrigen Dosisbereich hingegen konnte mit den meisten in vitro- und in vivo-Systemen eine Schulter für die Dosiswirkungskurve beschrieben werden. Erstmals konnte von Puck und Marcus (1956) sowie von Elkind und Sutton (1959) an Säugerzellen in Kultur eine reduzierte Wirksamkeit der Strahlung im niedrigen Dosisbereich, bzw. eine Zunahme der relativen Dosiswirkung mit zunehmender Dosis nachgewiesen werden.

Es wird heute angenommen, daß zwei unterschiedliche Mechanismen der Strahlenschädigung zum Zelltod führen. Einmal kann es sich um ein einzelnes Ereignis handeln, welches alleine schon genügt, um einen irreparablen Schaden an den kritischen Zellstrukturen wie DNS hervorzurufen. Zum anderen ist wahrscheinlich, daß eine Interaktion von solchen Ereignissen, welche einzeln lediglich subeffektive und zudem reparable Schäden hervorrufen, letztendlich auch zum Zelltod führt. Mit zunehmender Akkumulation subletaler Strahlenschäden nimmt auch die Effektivität der Strahlung

zu. Diese sind jedoch reversibel, und in bestrahlungsfreien Pausen können subletale Strahlenschäden von den Zellen repariert werden. Hiermit erklärt sich die geringere Wirksamkeit einer fraktionierten Bestrahlung, wie sie für alle Säugerzellen nachgewiesen werden konnte.

Die klinische Verträglichkeit einer Bestrahlung hängt folglich u. a. von dem Einfluß der Fraktionierung auf die Gewebstoleranz ab. Fraktionierte Bestrahlung kann erst dann von therapeutischem Nutzen sein, wenn das mitbestrahlte Normalgewebe mehr subletalen Strahlenschaden erholen kann, als dies im gleichen Zeitraum der Tumor vermag.

In unseren Untersuchungen stieg die Strahlenresistenz mit zunehmender Fraktionierung deutlich an: eine ausgeprägte Erholung subletalen Strahlenschadens ließ sich an einer deutlichen Zunahme der isoeffektiven Gesamtdosen (Abb. 38) mit zunehmender Fraktionenzahl erkennen.

Basierend auf eben der Annahme, daß die Fraktion sterilisierter klonogener Zellen sowohl von dem Eintreffen einzelner letaler, wie auch durch die Akkumulation von subletalen Ereignissen bestimmt wird, wurde das linear-quadratische (LQ) Modell zur mathematischen Beschreibung von Dosiseffektbeziehungen vorgeschlagen (Douglas and Fowler, 1976; Kellerer and Rossi, 1978). Eine gute Annäherung an die Dosisüberlebensbeziehung für klonogene Zellen stellt die nach diesem Modell in Abhängigkeit von der Dosis berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit (SF) dar:

$$SF = e^{-[\alpha \times D + \beta \times (D)^2]} \quad (1)$$

Dabei sind die Konstanten " α " bzw. " β " Maßzahlen

für die Wahrscheinlichkeit des Eintreffens irreparabler bzw. subeffektiver Ereignisse; "D" steht für die eingestrahlte Dosis. Die resultierenden Dosis-Überlebenskurven sind gekennzeichnet durch einen initial nahezu exponentiellen Verlauf (d.h. linear in der halblogarithmischen Darstellung), maßgeblich bestimmt durch die Maßzahl α und eine anschließend mit der Dosis zunehmende Krümmung. Der quadratische Term im Exponenten beschreibt die steigende Effektivität der Strahlung mit zunehmender Akkumulation subletaler Ereignisse. Dabei definiert das Verhältnis aus α und β die Strahlendosis, bei der die beiden Prozesse zu gleichen Teilen zur Sterilisation klonogener Zellen beitragen (Fowler, 1984).

Barendsen (1982) hat diesen Formalismus vereinfacht bzw. verallgemeinert. Es wird angenommen, daß die beobachteten Effekte nur abhängig von der Fraktion überlebender Zellen sind, und daß Repopulierung im Laufe des Bestrahlungsprotokolles vernachlässigt werden kann; das heißt die gleiche Fraktion überlebender Zellen führt zu gleichen funktionellen Veränderungen, sprich zum gleichen Effekt (E), unabhängig von dem verwendeten Bestrahlungsprotokoll. Gleichung 1 kann entsprechend umgeschrieben werden:

$$-\log_e SF = E = \alpha \times D + \beta \times D^2 \quad (2a)$$

Nach Bestrahlung mit "n" Fraktionen einer Dosis "d" kann die Gesamtdosis "D" in Gleichung 2a durch "n x d" ersetzt werden:

$$E = \alpha \times n \times d + \beta \times n \times d^2$$

entsprechend gilt:

$$E = n \times d (\alpha + \beta \times d) \quad (2b)$$

daraus folgt nach Umformung

$$1/n \times d = \alpha/E + (\beta/E) \times d \quad (3)$$

Wenn $1/(n \times d)$ gegen d aufgetragen wird für verschiedene isoeffektive Fraktionierungsschemata (als Fe - Darstellung isoeffektiver Beziehungen bezeichnet), definiert die Regressionsgerade mit der Steigung β/E und dem Schnittpunkt mit der Abszisse α/E die Beziehung (Douglas and Fowler, 1976). Wenn die Überlebensrate der kritischen Zellen bei dem gewählten Isoeffekt bekannt ist, lassen sich daraus die Koeffizienten α (Gy^{-1}) und β (Gy^{-2}) berechnen. Aber selbst wenn die Überlebensrate nicht bekannt ist, kann anhand der Regressionsanalyse reziproker isoeffektiver Gesamtdosen in Abhängigkeit von der Dosis pro Fraktion das Verhältnis aus α und β bestimmt werden. Dieses ist ein Maß für die Empfindlichkeit des untersuchten Gewebes gegenüber Veränderungen in der Dosisfraktionierung (Thames et al, 1982).

Eine große Anzahl von Studien mit funktionellen Endpunkten unterstützen die Annahme, daß bezüglich des Wertes des Quotienten α/β große Unterschiede zwischen früh und spät reagierenden Geweben bestehen (Thames and Hendry, 1987; Trott, 1984; Withers et al, 1982). So sind die Dosiswirkungsbeziehungen in früh reagierenden Geweben des kleinen Nagers und des Schweines durch ein relativ hohes α - β -Verhältnis gekennzeichnet, während das Verhältnis wesentlich kleiner ist in spät reagierenden Geweben (vergl. Tab. 20). Klinische Studien an der Haut und anderen Geweben bestrahlter Tumor-Patienten bestätigen die Beobachtungen, daß spät reagierende Gewebe durch Reduzierung der

Dosis pro Fraktion mehr geschont werden als solche, welche akute strahleninduzierte Veränderungen entwickeln (Overgaard, 1987; Singh, 1978; Turresson and Notter, 1984 [a] und [b]).

Tab. 20: Schätzwerte von α/β für eine Reihe von Normalgeweben nach Thames and Hendry (1987)

GEWEBE	AUTOR	α/β [Gy]
FRÜHE REAKTIONEN		
Haut	Fowler et al (1974)	9.4 (6.1-14.3)
	Douglas+Fowler (1976)	11.7 (9.1-15.4)
	Joiner et al (1986)	10.5 (8.5-12.5)
Lippe	Ang et al (1985)	7.9 (1.8-25.8)
Dünndarm	Withers et al (1975)	7.1 (6.8- 7.5)
Dickdarm	Tucker et al (1983)	8.4 (8.3- 8.5)
Hoden	Thames+Withers (1980)	13.9 (13.4-14.3)
SPÄTE REAKTIONEN		
Rückenmark	V.d. Kogel (1979)	2.5 (-0.7-7.7)
	Ang et al (1987)	3.4 (2.7- 4.3)
Niere	Caldwell (1975)	0.4 (-0.8-3.4)
	Williams+Denekamp (1984)	1.6 (1.0- 2.7)
Lunge	Wara et al (1973)	2.1 (0.2- 5.2)
	Field et al (1976)	4.3 (3.8- 4.9)
Unterhaut	Withers et al (1978)	0.3 - 2.4
Knochen	Arnold (1988)	3.9 (2.5- 5.3)

Nach Williams et al (1985) lagen für 36 von 48 untersuchten experimentellen Tumoren die resul-

tierenden α - β -Werte immer und zum Teil um ein Vielfaches über 8 Gy. Ein systematischer Unterschied dieser Art kann durch eine Modifikation des Fraktionierungsschemas ausgenutzt werden, der sich in einer erhöhten Tumorkontrollwahrscheinlichkeit bei gleichbleibender Normalgewebsschädigung bzw. in einer Reduktion letzterer bei gleichem tumoriziden Effekt äußert.

In Abbildung 39 ist der reziproke Wert der isoeffektiven Gesamtdosen, bei denen die Hälfte der untersuchten Bohrlöcher 40% und weniger knöchern verschlossen waren, gegen die Dosis pro Fraktion aufgetragen. Die ermittelte Regressionsgerade ist gut definiert (der Korrelationskoeffizient hat

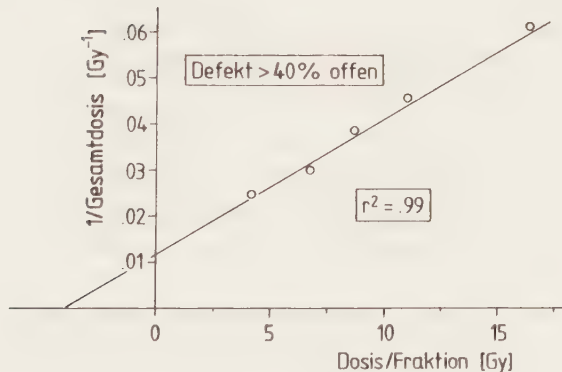


Abb. 39: Fe-Diagramm: Der Kehrwert der isoeffektiven Gesamtdosis ($ED_{50/40\%}$) ist als Funktion der Dosis pro Fraktion aufgetragen. Die Datenpunkte liegen auf einer gut definierten Geraden ($r=0.99$); Der Schnittpunkt mit der Ordinate liegt bei 4.0 Gy und entspricht dem α/β -Wert.

den Wert 0.99) und ergab einen α/β - Wert von 4.0 Gy (Schnittpunkt mit der Ordinate).

Nach Tucker (1984) können α/β - Werte nur dann auf diese Weise ermittelt werden, wenn die Eignung des linear-quadratischen Modells zur Analyse strahleninduzierter Gewebsveränderungen nachgewiesen ist. Eine Methode, dies zu prüfen besteht darin, die Differenzen isoeffektiver Gesamtdosen (" D_m " bzw. " D_n ") einzelner Fraktionierungsprotokolle

$$D = D_m - D_n \quad (5a)$$

den Umkehrdifferenzen aus dem Produkt aus diesen und der zugehörigen Dosis pro Fraktion (" d_m " bzw. " d_n ")

$$D \times d = (D_n \times d_n) - (D_m \times d_m) \quad (5b)$$

gegenüberzustellen.

Läßt sich das Versuchsmodell mit dem LQ-Formalismus beschreiben, dann sollte das Intercept der Regressionsgeraden mit der Ordinate nicht signifikant verschieden von Null sein und ihre Steigung (β/α) ein positives Vorzeichen aufweisen.

Die strahleninduzierte Störung der regenerativen Kapazität im Rattenfemur läßt sich gut mit dem LQ-Modell beschreiben (Abb. 40). Bedingt durch die Schwankung der Werte in den jeweiligen Versuchen besteht eine geringe aber nicht signifikante Abweichung vom Nullpunkt. Der β/α -Wert von 0.17, der sich aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt, stimmt gut mit dem im Fe-Plot bestimmten α/β -Wert (4.0 Gy) überein.

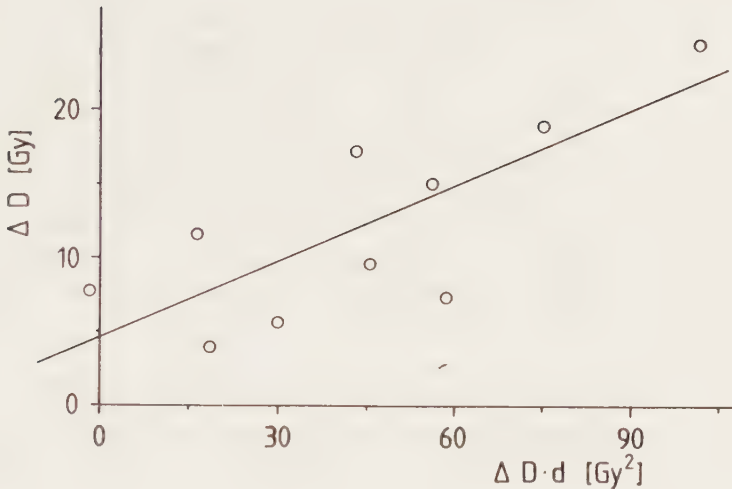


Abb. 40: Zeichnerische Bestimmung des β/α -Wertes nach Tucker (1984). Der sich ergebende Wert beträgt 0.17 Gy^{-1} . Die Geradengleichung lautet $f(x) = 4.8 + 0.17x$. Der Korrelationskoeffizient (r) beträgt 0.78.

Unsere Daten wurden zudem von H. D. Thames et al. (M. D. Anderson Hospital, Houston, Texas) nach der von ihnen entwickelten direkten Annäherung zur Bestimmung der Koeffizienten der LQ-Gleichung analysiert (Thames et al, 1986). In der üblichen Zwei-Schritt-Methode, wie der oben beschriebenen Fe-Darstellung, werden zuerst anhand quantalisierten Daten mittels Probit-Analyse ED_{50} -Werte für die unterschiedlichen Fraktionierungsschemata bestimmt. Anschließend wird der reziproke ED_{50} -Wert gegen die Dosis pro Fraktion aufgetragen und

mittels linearer Regression analysiert. Da die Fehlerabschätzung aus der Probitanalyse jedoch nicht in die Regressionsanalyse mit eingeht, ist eine solche für die Steigung der Regressionsgeraden β/E und dem Schnittpunkt mit der Ordinate α/E , und somit auch für das Verhältnis aus α und β nicht möglich. In der von Thames et al (1986) beschriebenen Analyse werden alle Rohdaten in einem "Maximum-Likelihood-Verfahren" gemeinsam analysiert. Das Verfahren hat den entscheidenden Vorteil, daß der 95% Vertrauensbereich für die Parameter berechnet werden kann.

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten definierter Effekte (P_{eff}) läßt sich demnach in Abhängigkeit von der Dosis ("D") nach folgender Formel berechnen:

$$P_{\text{eff}} = e^{-e^{(\ln K - \alpha \times D - \beta \times D^2)}} \quad (6)$$

Dabei entspricht " $\ln K$ " einer gewebsspezifischen Konstante.

Die für unterschiedliche Effektniveaus in der 6. und 7. Woche errechneten Werte für die Koeffizienten α und β der LQ-Gleichung unterscheiden sich nur wenig voneinander. Ebenso konnten diesbezüglich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten gefunden werden. Aus der gemeinsamen Analyse dieser Daten für die Wahrscheinlichkeit, daß das Defektvolumen 40% oder weniger knöchern verschlossen ist, berechnete sich ein α/β -Wert von 3.9 Gy (2.5-5.3 Gy), welcher gut mit dem mittels Fe- und Tucker - Plot ermittelten übereinstimmt (Tab. 21). Die Werte für α bzw β waren 0.0681 Gy⁻¹ und 0.01765 Gy⁻².

Tab. 21: Direkte Analyse der quantalen Daten (Heilperiode 6-7 Wochen) nach Thames et al (1986) für unterschiedliche Niveaus der Knochenheilungsstörung (Bohrlochdefekt weniger als 50, 40 bzw. 30% knöchern verschlossen); 95% Vertrauensbereich in Klammern

Heilungsniveau	α/β [Gy]	10α [Gy ⁻¹]	100β [Gy ⁻²]
50%	3.26 (1.4-5.3)	0.60 (.82-.39)	1.84 (2.2-1.5)
40%	3.86 (2.5-5.2)	0.68 (.89-.47)	1.77 (2.1-1.4)
30%	3.77 (2.4-5.2)	0.63 (.84-.43)	1.68 (2.0-1.4)

Dieser Quotient definiert eine Erholungsfähigkeit, wie sie für langsam proliferierende Gewebe als typisch angesehen werden kann. Die minimale Fraktionsdosis, bei der keine spürbare weitere Schonung mitbestrahlter Normalgewebe zu erwarten ist, liegt in etwa bei 5-15% des α/β - Werte (Tucker and Thames, 1983). Es ist somit zu erwarten, daß eine Sättigung der Erholbarkeit erst bei Dosen pro Fraktion eintritt, die deutlich unter den üblicherweise verwendeten 2 Gy liegen.

Die erhebliche Kapazität zur Erholung subletalen Strahlenschadens läßt sich auch in anderer Form dokumentieren. In Abb. 41 sind, in Anlehnung an Withers et al (1982), die benötigten Gesamtdosen zur Erzielung definierter Effekte in verschiedenen Geweben wie auch im Knochen im doppelten Logarithmus gegen die Dosis pro Fraktion aufgetragen (Tab. 22). Für die strahlenbedingte Störung

Tab. 22: Frühe bzw. späte Normalgewebesreaktionen nach fraktionierter Bestrahlung (Withers et al, 1982)

GEWEBE		LITERATURQUELLE
SPÄTE REAKTIONEN		
Rückenmark	(1)	White and Hornsey, 1978
Rückenmark	(3)	Van der Kogel, 1977
Dermis	(2)	Hopewell et al, 1979
Dermis	(5)	Withers et al, 1978
Niere	(4)	Caldwell, 1975
Niere	(7)	Hopewell and Wiernik, 1977
Lunge	(6)	Wara et al, 1973
FRÜHE REAKTIONEN		
Magen, Milz	(8)	Withers, 1975
Haut	(9)	Fowler et al, 1974
Haut	(10)	Douglas and Fowler, 1976
Colon	(11)	Withers and Mason, 1974
Hoden	(12)	Thames and Withers, 1980
Jejunum	(13)	Thames et al, 1981

der Knochenheilung mit Reduktion des verschlossenen Volumens auf 40% und weniger in der Hälfte der Bohrlöcher nimmt die isoeffektive Dosis mit abnehmender Dosis pro Fraktion relativ mehr zu, als dies für Isoeffekte in akut reagierenden Geweben der Fall ist. Die relative Steilheit der Steigung für die Isoeffektbeziehungen für späte Effekte wie auch für unser Modell deuten darauf hin, daß die Sterilisation von Zellen weniger durch einzeln letale Ereignisse, sondern hauptsächlich durch die Akkumulation und Interaktion subletaler Ereignisse zustande kommt.

tur (Elkind and Sutton, 1960) wie auch durch Regeneration durch Reparation (Latja and Oliver, 1962) erholt werden kann, veranlaßte Fowler und Stern (1963) zu einer Analyse isoeffektiver Dosisbeziehungen in Abhängigkeit der applizierten Anzahl von Fraktionen, in Anlehnung an den von Strandquist verwendeten Formalismus.

1969 führte Ellis, basierend auf den beschriebenen Erkenntnissen, einen Formalismus ein, den er "Nominal Standard Dose" nannte und dessen Einheit das "Röntgen Equivalent Therapy" (ret) war. Die Gesamtdosis wurde als proportional einer Potenzfunktion von der Zeit (mit einem Exponenten von 0.11) und von der Fraktionenzahl (mit einem Exponenten von 0.24) angenommen.

$$D = \text{NSD} \times T^{0.11} \times N^{0.24}$$

["NSD" stellt eine Konstante dar, die proportional der Strahlenwirkung im normalen Gewebe ist bzw. die die Toleranz definiert, welche meist bei 1750 ret liegt]

Aus diesem Formalismus heraus wurden eine Reihe von einfachen mathematischen Modellen abgeleitet, zur Berechnung isoeffektiver Gesamtdosen bei verändertem Bestrahlungsprotokoll, welche in den folgenden Jahren weltweit klinische Anwendung fanden (Ellis, 1971; Orton and Ellis, 1973).

In einer Reihe von klinischen Studien sowie experimentellen Untersuchungen konnte in der folgenden Zeit jedoch nachgewiesen werden, daß dieser Formalismus nur begrenzte Gültigkeit besitzt (Berry et al, 1974; Fowler, 1984; Masuda et al, 1980; Singh, 1978). In einigen Geweben lassen sich frühe Veränderungen, wie epidermale Reak-

tionen der Haut, in einem Bereich von 4-32 Fraktionen gut voraussagen; bei Verwendung einer geringeren bzw. höheren Anzahl von Fraktionen liegen die tatsächlichen isoeffektiven Gesamtdosen unter den berechneten, was zu einer Überdosierung der Gewebe führt (Singh, 1978; Turesson and Notter, 1984). Hingegen wurden für eine Reihe hauptsächlich spät reagierender Gewebe Exponenten für N und T ermittelt, welche sich erheblich von denjenigen der Ellis-Formel (1969) unterschieden (Hornsey et al, 1981; Field et al, 1976). So entwickelte van der Kogel (1977) das Neuret, mit den Exponenten von 0.032 bzw. 0.44 für T bzw. N.

Die Annahme einer Potenzfunktion für die Zeit mit einem Exponenten von 0.11 besagt, daß am 1. Tag etwa 8%, am zweiten lediglich mehr 4.5%, am dritten 3% usw. der eingestrahlten Dosis durch Repopulierung erholt werden. Tatsächlich setzt Repopulierung jedoch erst im Anschluß an eine Latenzphase von einigen Tagen bis zu Wochen ein und nimmt dabei in der initialen Phase häufig noch an Ausmaß zu (Denekamp, 1973; Douglas and Fowler, 1976; Kummermehr and Trott, 1982).

Wir haben die isoeffektiven Gesamtdosen, bei denen die Hälfte der Bohrlöcher 40% und weniger knöchern verschlossen waren, in Abb. 42 im doppelten Logarithmus gegen die Dosis aufgetragen und erhalten dabei eine gut definierte Gerade ($r^2 = 0.97$) mit der Steigung von 0.41. Da wir nach unseren Erkenntnissen davon ausgehen können, daß die Zeit keinen Effekt auf die Dosisabhängigkeit der Strahlenwirkung besitzt, wäre T ein Exponent von Null und N ein solcher von 0.41 zuzuordnen; diese entsprechen weitgehend den für Gehirn, Rückenmark und Lunge bestimmten Konstanten und unterscheiden sich wie diese stark von jenen in der Ellis-Formel (Hornsey and White, 1980).

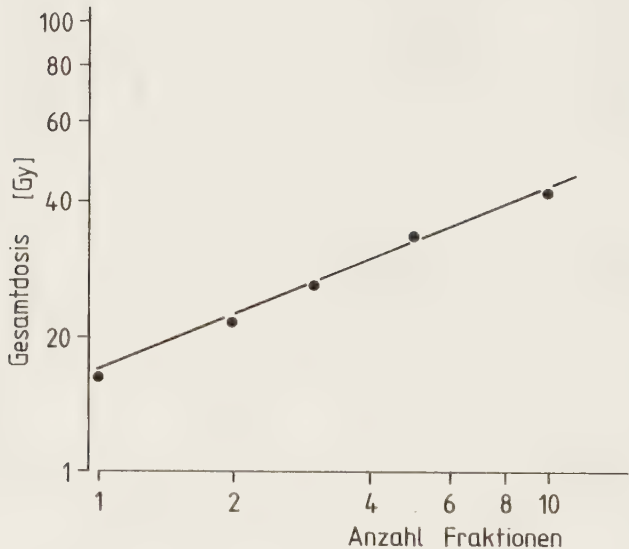


Abb. 42: Die Beziehung zwischen isoeffektiver Gesamtdosis und Zahl der Fraktionen bei der strahleninduzierten Hemmung der Knochenheilung. Darstellung im doppellogarithmischen Maßstab nach Fowler und Stern (1963).

Es konnte gezeigt werden, daß Fraktionierung eine deutliche dosismodifizierende Wirkung auf die strahleninduzierte Störung der regenerativen Kapazität im Knochen der adulten Wistarratte besitzt. Die isoeffektiven Gesamtdosen lassen sich mit guter Genauigkeit durch eine linear-quadratische Gleichung beschreiben ($\alpha/\beta = 3.9$). Hingegen erscheint der von Ellis (1969) eingeführte Formalismus zu diesem Zweck ungeeignet.

Uns sind nur wenige Studien bekannt, welche die

Wund- bzw. Frakturheilungsstörung nach Vorbestrahlung mit fraktionierten Dosen untersucht haben. Vorbestrahlung mit 43.5 Gy einer ^{60}Co - Strahlung, (5 Gy/F und 5 F/Wo) reduzierte die mechanische Belastbarkeit von Ulnafrakturen im Kaninchen auf ein Drittel der Kontrolle im Anschluß an eine Heilperiode von 8 Wochen (Datta, 1983). Der Effekt einer Modifikation des Fraktionierungsschemas wurde jedoch leider nicht untersucht.

Einzig Hayashi und Suit (1971) haben eine ausführliche Studie über den Fraktionierungseffekt auf die Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten Hemmung der Entwicklung eines äußeren Frakturkallus im Mäusefemur untersucht. Wir haben die von ihnen publizierten Rohdaten in einen Fe-Plot übergeführt. Da die verwendeten Versuchsschemata ungleiche Dosen pro Fraktionen beinhalteten, mußte hierzu eine Verallgemeinerung für den Term der Dosis pro Fraktion angewendet werden. Die entsprechende linear-quadratische Gleichung ergibt sich aus 3:

$$1/D = \alpha/E + \beta/E \times \quad \text{di} \quad (4)$$

Die graphische Darstellung resultiert wiederum in einer Regressionsgeraden mit dem Ordinaten-schnittpunkt α/E und der Steigung β/E ; der Wert für α/β ergibt sich wiederum aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse.

Aus der Fe-Darstellung ermittelte sich ein α/β - Wert von 7.0 Gy, der annähernd doppelt so groß war, wie der in unserem System gefundene und zwischen dem für akut und für spät reagierende Gewebe liegt. Die Frakturen waren in den von Hay-

ashi und Suit (1971) durchgeführten Untersuchungen nicht stabil fixiert. Die Frakturheilung läuft somit über die Entwicklung eines intermediären primär knorpeligen Kallus ab. Bonarigo und Rubin (1967) beobachteten eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Reparaturgewebe in fixierten bzw. unfixierten Frakturen in der Tibia der Ratte. Cooley (1958) konnte nach Einzeildosen von 2000 R zwar die Entwicklung eines knorpeligen Frakturkallus in der frakturierten Mäuseulna beobachten; eine solche eines sekundären knöchernen Kallus, wie sie in den Kontrollen spätestens ab der 3. Woche beobachtet werden konnte, blieb jedoch bis zur 6. Woche aus. Dieser Befund konnte später von Green (1969) an fraktioniert bestrahlten (5 x 4 Gy 250 kV Röntgenstrahlen) Tibiafrakturen der Sprague Dawley Ratte bestätigt werden. Kember (1967) konnte in der bestrahlten knorpeligen Wachstumsfuge der Maus nur einen geringen Fraktionierungseffekt feststellen.

Wir gehen davon aus, daß chondrogene und osteogene Gewebe sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit unterscheiden und auch unterschiedlich empfindlich auf eine Veränderung in der Dosisfraktionierung reagieren.

4.6

Schlußfolgerung

Die strahleninduzierte Schädigung mesenchymaler retikulärer Gewebselemente bedingt eine Abnahme von matrixbildenden Zellen und ihrer Vorläufer (Fibro- bzw. Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen). Die Folgen sind Atrophie bzw. Osteopenie, sowie gestörte Zunahme der knöchernen Konsolidierung im Anschluß an ein Trauma. Die Strahlenfolgen entwickeln sich entsprechend der niedrigen

Zellumsatzgeschwindigkeit langsam in den intakten Geweben und schnell nach Stimulierung durch Wundsetzen. Die strahleninduzierte Frakturheilungsstörung ist Folge einer direkten Schädigung mesenchymaler und endothelialer Zellen mit Stammzellcharakter. Hierfür spricht unter anderem auch die Tatsache, daß die Dosiswirkung relativ unabhängig vom Intervall zwischen Bestrahlung und Traumatisierung ist.

Die Frakturheilung ist maßgeblich eine Leistung eben jener Zellen, welche im ruhenden reifen Knochen an den stetig ablaufenden Remodellierungsvorgängen beteiligt sind. Sie stellt ein Modell dar, an welchem die Strahlenschädigung mesenchymaler Gewebelemente wie unter einer Lupe und zudem im Zeitraffer untersucht werden können.

Das Bohrloch ist ein geeignetes Modell zur Analyse der Dosisabhängigkeit der Strahlenwirkung und zur Untersuchung isoeffektiver Beziehungen.

Der Verlauf der Defektheilung im Oberschenkelknochen von Ratten war nach Vorbestrahlung mit Einzeldosen von 14-22 Gy dosisabhängig verzögert und vermindert. Eine Dosis von 17 Gy verringerte die Menge neugebildeten Knochens auf 50% der Kontrolle in der Hälfte der Tiere, unabhängig vom zeitlichen Intervall zwischen Bestrahlung und operativem Eingriff. Deshalb kann mit einer Toleranzsteigerung der regenerativen Kapazität im Knochen, wie sie bei Verlängerung des Intervalls zwischen Vorbestrahlung und dem chirurgischen Eingriff häufig angenommen wird (Mansfield, 1979), nicht gerechnet werden.

Ein ausgeprägter Fraktionierungseffekt konnte gefunden werden. Der aus der linear-quadratischen

Dosiswirkungsbeziehung abgeleitete Quotient aus den Koeffizienten der entsprechenden Gleichung ($\alpha/\beta = 3.9 \text{ Gy}$) definiert eine Erholungsfähigkeit, wie sie für langsam proliferierende Gewebe als typisch angesehen werden kann. Dies läßt erwarten, daß eine Sättigung der Erholbarkeit erst bei Dosen pro Fraktion eintritt, die deutlich unter den üblicherweise verwendeten 2 Gy liegen.

Die Kombination therapeutischer Strahlendosen mit einer chirurgischen Intervention in der Behandlung maligner Geschwülste kann einen hemmenden Einfluß auf die Knochenheilung ausüben. Wir konnten zeigen, daß das Bohrloch - als definierter kortikaler Defekt im Oberschenkelknochen der weiblichen Wistar ratte - ein geeignetes Modell darstellt zur Untersuchung dieser Problematik.

Eine qualitative Analyse, der im Bohrlochdefekt beobachteten Heilmechanismen ergab, daß diese weitgehend denjenigen nach Metallplattenosteosynthese bzw. Marknagelung im Menschen beobachteten entsprechen. Der initiale Heilungsprozess ist gekennzeichnet durch die Bildung eines primären knöchernen Kallus. Der unreife spongiöse Knochen wird anschließend zu lamellärem Knochen umgebaut.

Es wird eine morphometrische Technik beschrieben, die den knöchern verschlossenen Anteil im Bohrlochdefekt einer Messung zugänglich macht, und somit eine Quantifizierung von Dosiseffekten auf die strahleninduzierte Knochenheilungsstörung erlaubt.

Vorbestrahlung mit Einzeitdosen von 14 - 22 Gy und einem Intervall von 24 Stunden verzögert das Einsetzen und den Ablauf der Heilmechanismen dosisabhängig. Die Dosiswirkungsbeziehung der strahleninduzierten Knochenheilungsstörung verläuft steil; die $ED_{50/40\%}$ - das ist die Dosis, bei der die Hälfte der Bohrlöcher, im Anschluß an eine 6-7 wöchige Heilperiode, weniger als 40% knöchern verschlossen sind - berechnet sich auf 16.5 Gy. Die Dosisabhängigkeit der Knochenhei-

lungsstörung ist unabhängig von dem zeitlichen Abstand zwischen Vorbestrahlung und chirurgischem Eingriff, zumindest für Intervalle bis zu 6 Monaten.

In Fraktionierungsexperimenten zeigte sich die Knochenheilungsstörung empfindlich gegenüber einer Veränderung in der Dosisfraktionierung. Die erhebliche Kapazität zur Erholung subletalen Strahlenschadens zeigt sich in einem starken Anstieg isoeffektiver Gesamtdosen und einem zunehmend flacheren Verlauf der Dosiseffektkurven mit zunehmender Anzahl Fraktionen. Die direkte Analyse der Daten nach Thames et al (1986) ergab einen Quotienten von 4 Gy aus den Koeffizienten " α " und " β " der linear-quadratischen Gleichung. Eine Sättigung der Erholbarkeit ist erst bei niedrigen Dosen um 0.4 Gy pro Fraktion zu erwarten.

Nach unseren Erfahrungen hemmt Vorbestrahlung mit Einzeitdosen bzw. mit wenigen fraktionierten Strahlendosen die Knochenheilung schon im therapeutischen Dosisbereich. Die Komplikationsrate (der Prozentsatz an Bohrlöchern, welche ein vorgegebenes Heilungsniveau im Anschluß an eine definierte Heilperiode nicht erreichen) nimmt mit der eingestrahlten Dosis zu. Dieser Befund stimmt im wesentlichen mit den Ergebnissen aus Untersuchungen über die strahleninduzierten Störungen in der Heilung von kutanen bzw. abdominalen Wunden, intestinalen Anastomosen, sowie Knochenheilungsstörungen überein.

Der Effekt ist nach unseren Erkenntnissen unabhängig von dem Intervall zwischen Bestrahlung und operativem Eingriff. Eine Toleranzsteigerung ist bei Verlängerung des zeitlichen Abstandes zwischen diesen somit nicht zu erwarten.

Hingegen unterscheidet sich der von uns beobachtete Fraktionierungseffekt auf die Knochenheilungsstörung nach Vorbestrahlung erheblich von der für menschliche und tierexperimentelle Tumoren nachgewiesenen Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen in der Dosisfraktionierung. Dieser Unterschied kann durch eine Modifikation des konventionellen Fraktionierungsschemas hin zu stärkerer Fraktionierung therapeutisch genutzt werden. Damit ließe sich bei gleichbleibender tolerierbarer Wundheilungsstörung eine erhöhte Tumorkontrollwahrscheinlichkeit, bzw., wenn diese gleich gehalten wird, eine Reduktion in der Störung der Reparaturfähigkeit erzielen.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF RADIATION DOSE AND DOSE FRACTIONATION ON THE OSSEOUS HEALING OF A WELL DEFINED CIRCUMSCRIBED CORTICAL DEFECT IN THE RAT FEMUR

The combination of surgery and pre-irradiation with doses in the therapeutic range for therapy of malignant tumors may result in delayed bone healing. We were able to demonstrate that the healing of a well defined circumscribed defect in the cortical bone of adult female Wistar rats is a model well suited for the investigation of these problems.

Normal healing of burr holes has been determined by means of histological sections. Healing mechanisms have been shown to be rather similar to those observed in man after rigid plate and screw fixation or intramedullary nailing. The initial

healing process is characterized by primary bony callus formation. This immature spongy bone is subsequently remodelled to become mature and lamellated.

We have developed a morphometrical technique which allows the quantification of osseous healing under normal and irradiated conditions. A quantitative analysis of dose effects on radiation induced delay in osseous healing is presented.

Irradiation with single doses 24 hours prior to surgery delays the onset and development of healing mechanisms in the femoral defect. The resulting dose effect relationship is steep. The $ED_{50/40\%}$ is 16.5 Gy and this is the dose which reduces the amount of new formed bone, after a 6 to 7 week healing period, to 40% of the volume of the bone. The dose dependence of radiation effects on osseous healing is independent of the interval (up to 6 months) between irradiation and surgery.

Radiation induced delay in bone healing was shown to be significantly affected by dose fractionation. A pronounced capacity of recovery from sublethal damage is visible both from the increase in iso-effective dose and a decreasing curve slope with increasing fraction number. With the direct analysis of the data according to the linear quadratic model (Thames et al, 1986) an α/β ratio of 4 Gy is obtained. The largest fractional dose for which further fractionation produces no significant change in the total iso-effective dose is estimated to be 0.4 Gy.

Pre-irradiation with single doses in the therapeutic range, or with large fractionated doses,

is shown to delay bone healing. The complication rate (the percentage of holes with osseous closure being reduced to a given level) increases with increasing dose. This is in good agreement with the findings of several authors on the radiation induced delay in healing of wounds of the skin or the abdominal wall, of intestinal anastomoses and delay in fracture healing of long bones. We believe this effect to be independent of the length of the interval between irradiation and surgery. As a clinical consequence, no increase in tolerance of bone and healing mechanisms can be expected when the interval between irradiation and trauma is prolonged.

We did, however, observe a pronounced fractionation effect on the radiation induced delay in bone healing, and this is different from the sensitivity of human and rodent tumors to changes in dose fractionation. Thus, when changing to fractionation schemes with increasing number of smaller doses per fraction, a therapeutic gain can be expected as a clinical consequence. This would result either in an increase in the tumor control probability with still acceptable incidence of complications in bone and healing mechanisms, or in additional sparing of the latter while achieving equal tumor responses.

LITERATURVERZEICHNIS

Albrektsson, T., Jacobsson, M., Turesson, I.: Irradiation injury of bone tissue. Acta Radiol. Oncol., 19: 235-239, 1980.

Anderson, L.D.: Compression plate fixation and the effect of different types of internal fixation on fracture healing. J. Bone Joint Surg., 47-A: 191-208, 1965.

Anderson, N.D., Colyer, R.A., Riley, L.H.: Skeletal changes during prolonged external irradiation: Alterations in marrow, growth plate and osteoclast populations. John Hopkins Med. J., 145: 73-83, 1979.

Ang, K.K., Xu, F-X., Landuyt, W., Van der Schueren, E.: The kinetics and capacity of repair of sublethal damage in mouse lip mucosa during fractionated irradiations. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 11: 1977-1983, 1985.

Ang, K.K., Thames, H.D., Van der Kogel, A.J., Van der Schueren, E.: Is there an influence of fraction size on repair kinetics in the spinal cord? Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 13, 557-562, 1987.

Anthony P., Keys, H., Evarts, C., Rubin, P.: Prevention of heterotopic bone formation with early post-operative irradiation in high risk patients undergoing total hip arthroplasty: comparison of 10 Gy vs 20 Gy schedules. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 13: 365-369, 1987.

Archer, R.R., Greenwell, E.J., Ware, T., Weeks, P.M.: Irradiation effect on wound healing in rats. *Radiat. Res.*, 41: 104-112, 1970.

Arnold, J.S., Jee, W.S.: Bone growth and osteoblastic activity as indicated by radioautographic distribution of plutonium. *Am. J. Anat.*, 101: 367-417, 1957.

Aryian, S., Marfuggi, R.A., Harder, G., Goodie, M.M.: An experimental model to determine the effects of adjuvant therapy on the incidence of postoperative wound infection: I. Evaluating preoperative radiation therapy. *Plast. Reconstr. Surg.*, 65: 328-337, 1980.

Ash, P., Loutit J.F., Townsend, K.M.S.: Osteoclasts derived from haemopoietic stem cells. *Nature*, 283: 669-670, 1980.

Babicky, A., Kolar, J.: Generalized skeletal response to local radiation injury. *Radiat. Res.*, 27: 108-110, 1966.

Barendsen, G.W.: Dose fractionation, dose rate and isoeffect relationship for normal tissue responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 1981-1999, 1982.

Bassett, C.A., Herrmann, I.: The influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. *Nature*, 190: 460-461, 1961.

Berry, R.J., Wiernik, G., Patterson, T.J.S., Hopewell, J.W.: Excess late subcutaneous fibrosis after irradiation of pigskin consequent upon the application of the NSD formula. *Brit. J. Radiol.*, 47: 277-281, 1974.

Beumer, J., Curtis, T., Harrison, R.E.: Radiation therapy of the oral cavity: Sequelae and management, part I. Head and Neck Surgery, 1: 301-312, 1979.

Bonarigo, B.C., Rubin, P.: Nonunion of pathologic fracture after radiation therapy. Radiology, 88: 889-898, 1967.

Bragg, G.D., Shidnia H., Chu, F.C., Higinbotham, N.L.: The clinical and radiographical aspects of radiation osteitis. Radiology, 97: 103-11, 1970.

Burger, E.H., Van der Meer, J.W.M., Van de Gevel, J.S.: Origin of osteoclast from immature mononuclear phagocytes. In "Current Advances in Skeletogenesis. Development, Biomineralization, Mediators and Metabolic Disease" (M. Silbermann and H.C.Slavkin ed); Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton, pp 87-92, 1982

Caldwell, W.L.: Time-dose factors in fatal post-irradiation nephritis. In "Cell Survival After Low Doses of Radiation: Theoretical and Clinical Applications" (T. Alper ed); John Wiley and Sons, Bristol, pp 328-332, 1975.

Cavadias, A.X., Trueta, J.: An experimental study of the vascular contribution to the callus of fracture. Surg. Gynec. Obstet., 120: 731-747, 1965.

Chalmers, J., Gray, D.H., Rush, J.: Observation on the induction of bone in soft tissue. J. Bone Joint Surg., 57-B: 36-45, 1975.

Chambers, F., Ogden, H., Coggs, G., Crane, J.: Mandibular osteomyelitis in dogs following irradiation. Oral Surg., 11: 843-859, 1958.

Chambers, T.J.: Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin - induced quiescence. In "Current Advances in Skeletogenesis. Development, Biomineralization, Mediators and Metabolic Disease" (M. Silbermann and H.C.Slavkin ed); Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton, pp 160-165, 1982

Cluzet, J.: Action des rayons X sur le developpement du cal. Lyon Med, 114: 22-24, 1910.

Cohn, S.H.: Effect of ageing and X-irradiation on the kinetics of skeletal metabolism in the rat. Radiat. Res., 15: 355-365, 1961.

Collins D.H.: In "The Pathology of Bone" (D.H. Collins ed); Butterwoths, London, 1966

Cooley, L.M., Goss, R.J.: The effects of transplantation and X-irradiation on the repair of fractured bones. Am. J. Anatomy, 102: 167-181, 1958.

Coventry, M.B., Scanlon, P.W.: The use of radiation to discourage ectopic bone. J. Bone Joint Sur., 63-A: 201-208, 1981.

Cutright, D.E., Brady, J.M.: Long term effects of radiation on the vascularity of rat bone - Quantitative measurements with a new technique. Radiat. Res., 48: 402-408, 1971.

Dalinka, M.K., Edeiken, J., Finkelstein, J.B.: Complications of radiotherapy: adult bone. Semin. Roentgenol., 9: 29, 1974.

Daly, T.E., Drane, J.B.: Osreoradionecrosis of the jaws. Cancer Bull., 24: 86-89, 1972.

Datta, R.: Quantitative determination of tolerance doses for preoperative and postoperative radiotherapy of bones. Med. Physics, 10: 243-245, 1983.

Denekamp, J.: Changes in the rate of repopulation during multifraction irradiation of mouse skin. Br. J. Radiol., 46: 381-387, 1973.

Devereux, D.F., Kent, H., Brennan, M.F.: Time dependent effects of adriamycin and X-ray therapy on wound healing in the rat. Cancer, 45: 2805-2810, 1980.

De Wilde, R., Boeckx, W., Van der Schueren, E., Guelinckx, P., Gruwez, J.: A scanning electron microscopic study of microvascular anastomoses on irradiated vessels: short-term effect of irradiation. Microsurgery, 4: 193-200, 1983.

Dickson, G.R.: The resorption of woven bone in rat fracture callus. In "Current Advances in Skeletogenesis. Development, Biomineralization, Mediators and Metabolic Disease" (M. Silbermann and H.C.Slavkin ed); Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton, pp 100-105, 1982

Dobbs, W.: A statistical study of the effect of röntgen rays on wound healing. Surgery, 41: 625-632, 1939.

Dotto, C.A., Mayo, J., Cabrini, R.L.: Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. Surgery, 130: 875-878, 1970.

Douglas, B.G., Fowler, J.F.: The effect of multiple small doses of X-rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. Radiat. Res., 66: 401-426, 1976.

Elkind, M.M., Sutton, H.: X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature*, 184: 1293-1295, 1959.

Elkind, M.M., Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.*, 13: 556-593, 1960.

Ellis, F.: Dose time and fractionation; a clinical hypothesis. *Clin. Radiol.*, 20: 1-7, 1969.

Ellis, F.: Nominal standard dose and the ret. *Br. J. Radiol.* 44: 101-108, 1971

Ergün, H., Howland, W.J.: Postradiation atrophy of mature bone. *CRC Crit. Rev. Diag. Imag.*, 12: 225-243, 1980.

Ewing, J.: Radiation osteitis. *Acta Radiol.*, 6: 399-412, 1926.

Field, S.B., Hornsey, S., Kutsutani, Y.: Effects of fractionated irradiation on mouse lung and a phenomenon of slow repair. *Br. J. Radiol.*, 49: 700-707, 1976.

Finston, R.A., Woodard, H.Q., Laughlin, J.S.: Effects of external irradiation on mineral metabolism in the bones of adult dogs. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 46: 183-201, 1966.

Fowler, J.F.: Review: Total doses in fractionated radiotherapy - Implications of new radiobiological data. *Int. J. Radiat. Biol.*, 46: 103-120, 1984.

Fowler, J.F., Denekamp, J., Delapeyer, C., Harris, S.R., Sheldon, P.W.: Skin reactions in mice after multifraction X-irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 25: 213-223, 1974.

Fowler, J.F., Stern, B.E.: Dose-time relationship in radiotherapy and the validity of cell survival curve models. *Br. J. Radiol.*, 36: 163-172, 1963.

Frandsen, A.: Effects of röntgen irradiation of the jaws on socket healing in young rats. *Acta Odont. Scand.*, 20: 307-331, 1962.

Friedenstein, A.J.: Precursors of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.*, 47: 327-359, 1976.

Geiser, M., Trueta, J.: Muscle action, bone rarefaction and bone formation. An experimental study. *J. Bone Joint Surg.*, 40-B: 282-311, 1958.

Gillette, E.L., Maurer, G.D., Severin, G.L.: Endothelial repair of radiation damage following beta irradiation. *Radiology*, 116: 175-177, 1975.

Gössner W., Luz A., Heuck F.: Knochen. In "Handbuch der Medizinischen Radiologie" (L. Diethelm, F. Heuck, O. Olsson, F. Struad, H. Vieten, A. Zuppinger eds); Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Band XX, pp 265-316, 1985

Gong, J.K., Vertalino, J.E., Kane, M.J.: The effect of X-irradiation on the marrow blood volume in rat tibia. *Radiat. Res.*, 39: 277-288, 1969.

Gorodetsky, R., McBride, W., Withers, H.R.: Early and late radiation effects on mouse wound healing. In "Proc. 8th Intern. Congr. Rad. Res." (Fielden, E.M., Fowler, J.F., Hendry, J.H., Scott, D. eds); Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia, vol. 1, p 280, 1987.

Gowgiel, J.M.: Experimental radio-osteonecrosis of the jaws. J. Dent. Res., 39: 176-197, 1960.

Green, N., French, S., Rodriguez, G., Hays, M., Fingerhut, A.: Radiation induced delayed union of fractures. Radiology, 93: 635-641, 1969.

Greene, E.C.: Anatomy of the Rat. Hafner Publ. Comp., New York, London, 1963.

Grillo, H.C.: Origin of fibroblast in wound healing: An autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local X-irradiation. Ann. Surg., 157: 453, 1963.

Grillo, H.C., Potsaid, M.S.: Studies in wound healing: IV. Retardation of contraction by local X-irradiation and observation relating to the origin of fibroblasts in repair. Ann. Surg., 154: 741-750, 1961.

Grimm, G.: Tierexperimentelle Untersuchung zur Phathogenese der radiogenen Knochenschädigung am Unterkiefer erwachsener Kaninchen. Deutsche Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, 53: 308-335, 1969.

Ham, A.W., Harris W.R.: Repair and transplantation of bone. In "The Biochemistry and Physiology of Bone" (G.H. Bourne ed [2nd ed]), Academic Press, New York, London, vol. 3, pp 338-378, 1971.

Hayashi, S., Suit, H.D.: Effect of fractionation of radiation dose on callus formation at site of fracture. Radiology, 101: 181-186, 1971.

Hebel R, Stromberg, M.W.: In "Anatomy of the Laboratory Rat" (R. Hebel, M.W. Stromberg eds); The Williams and Wilkins Comp., Baltimore, pp 1-41, 1976.

Hopewell, J.W., Wiernik, G.: Tolerance of the pig kidney to fractionated X-irradiation. In "Radiobiological Research and Radiotherapy" (E.R.A. Beck ed); IAEA, Wien, vol. 1, pp 65-73, 1977.

Hopewell, J.W., Young, C.M.A.: Changes in the microcirculation of normal tissues after irradiation. Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys., 4: 53-58, 1978.

Hopewell, J.W., Foster, J.L., Young, C.M.A., Wiernik, G.: Late radiation damage to pig skin. The effect of overall treatment time and number of fractions. Radiology, 130: 783-788, 1979.

Hornsey, S., White, A.: Isoeffect curve for radiation myelopathy. Br. J. Radiol. 53: 168, 1980.

Hornsey, S., Morris, C.C., Myers, R.: The relationship between fractionation and total dose for X ray induced brain damage. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 7: 393-396, 1981.

Howland, W.J., Loeffler, R.K., Starchman, D.E., Johnson, R.G.: Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. Radiology, 117: 677-685, 1975.

Isaacs, J.H., Thompson, W.B., Cassisi, N.J., Million, R.R.: Postoperative radiation of open head and neck wounds. *Laryngoscope*, 97: 267-270, 1987.

Jacobsson, M., Jönsson, A., Albrektsson, T., Turesson, I.: Dose response for bone regeneration after single doses of ^{60}Co irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11: 1963-1969, 1985.

Jacobsson, M., Kålebo, P., Albrektsson, T., Turesson, I.: Provoked repetitive healing of mature bone tissue following irradiation. *Acta Radiol. Oncol.*, 25: 57-62, 1986. ✓

Joiner, M.C., Denekamp, J., Maughan, R.L.: The use of 'top up' experiments to investigate the effect of very small doses per fraction in mouse skin. *Int. J. Radiat. Biol.*, 49: 565-580, 1986.

Kahnberg, K.E., Thilander, H.: Healing of experimental excisional wounds in the rat palate. *Swed. Dent. J.*, 11: 61-70, 1987.

Katzman, H., Waugh, T., Berdon, W.: Skeletal changes following radiation of childhood tumors. *J. Bone Joint Surg.*, 51-A: 825-842, 1969.

Kellerer, A.M., Rossi, H.H.: A generalized formulation of dual radiation action. *Radiat. Res.*, 75: 471-488, 1978.

Kember, N.F.: Cell survival and radiation damage in growth cartilage. *Br. J. Radiol.*, 40: 496-505, 1967.

Kenzora, J.E., Steele, R.E., Yosipovitch, Z.H., Glimcher, M.J.: Experimental osteoradionecrosis of the femoral head in adult rabbits. Clin. Orthop. Rel. Res., 130: 8-46, 1978

Ketcham, A.S., Hoye, R.C., Chretien, P.B., Brace, K.C.: Irradiation twenty-four hours preoperatively. Am. J. Surg., 118: 691-697, 1969.

King, M.A., Casarett, G.W., Weber, D.A.: A study of irradiated bone: I. Histopathologic and physiologic changes. J. Nucl. Med., 20: 1142-1149. 1983.

Knospe, W.H., Blom, J., Crosby, W.: Regeneration of locally irradiated bone marrow I. Dose dependent, long-term changes in the rat, with particular emphasis upon vascular and stromal reaction. Blood, 28: 398-415, 1966.

Kummermehr, J.: Mikroautoradiographische Untersuchungen über den Einbau und die Retention von Calcium - 45 im Kniegelenk der Ratte nach lokaler Röntgenbestrahlung mit 2000 R. Diss. med., München, 1973.

Kummermehr, J., Trott, K.R.: Rate of repopulation in a slow and a fast growing mouse tumour. In "Progress in Radio-Oncology" K.H. Karcher (ed), Raven Press, New York, pp. 299-307, 1982.

Latja, L.G., Oliver, R., Gurney, C.W.: Kinetic model of a bone-marrow stem-cell population. Brit. J. Haematol., 20: 422-460, 1962.

Lauk, S, Rüth, S., Trott, K.-R.: The effects of dose-fractionation on radiation-induced heart disease in rats. Radiother. Oncol., 8: 363-367, 1987.

Law, M.P.: Radiation - induced vascular injury and its relation to late effects in normal tissues. In "Advances in Radiation Biology" (J.T. Lett, H. Adler eds); Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Fransisco, vol 9, pp 37-73, 1981

Lawrence, W., Nickson, J.J., Warshaw, L.M.: Röntgen rays and wound healing. Surgery, 33: 376-384, 1953.

Little, K.: Bone formation and removal. In "Bone Behaviour" (K. Little ed), Academic Press, London and New York, pp 149-192, 1973

McKibbin, B.: The Biology of fracture healing in long bones. J. Bone Joint Surg., 60-B: 150-162, 1978.

McLean, F.C., Urist, M.R.: Bone. Fundamentals of the physiology of skeletal tissue (3d ed); The University of Chicago Press, Chicago, London, 1968.

Maloney, M. A., Patt, H. M.: Persistent marrow hypocellularity after local X-irradiation of the rabbit femur with 1000 rad. Radiat. Res., 50: 284-292, 1972.

Malska, I.W.: Microdensitometric analysis of the influence of X-irradiation on mature bone in humans. Acta Med. Pol., 12: 357, 1971

Mantravadi, R.U.P., Skolnik, E.M., Applebaum, E.L.: Complications of postoperative and preoperative radiation therapy in head and neck cancers. Arch. Otolaryngol., 107: 690-693, 1981.

Mansfield, C.: Effects of radiation therapy on wound healing after mastectomy. Clin. Plast. Surg., 6: 19-26, 1979.

Masters, F.W., Robinson, D.W.: Early operation, a conservative approach to the treatment of chronic irradiation injury. J. Trauma, 1: 583, 1961.

Masuda, K., Hunter, N., Withers, R.H.: Late Effect in mouse skin following single and multifractionated irradiation. Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys., 6: 1539-1544, 1980.

Morgenstern, L., Sanders, G., Wahlstrom, E, Yadegar, J., Amodeo, P.: Effect of preoperative irradiation on healing of low colorectal anastomoses. Am. J. Surg., 147: 246-249, 1984.

Melcher, A.H., Irving, J.T.: The healing mechanism in artificially created circumscribed defects in the femora of albino rats. J. Bone Joint Surg., 44-B: 928-936, 1962.

Moore, M.J.: The effect of radiation on connective tissue. Otolaryngol. Clin. North America, 17: 389-399, 1984.

Morrish, R.B., Chan, E., Silverman, S., Meyer, J., Fu, K.S., Greenspan, D.: Osteonecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma. Cancer, 47: 1980-1983, 1981.

Morse, B.S., Giuliani, D., Giuliani, E.R.: Effects of radiation on bone formation: a functional assessment. Radiat. Res., 60: 307-313, 1974

Moss, W., Brand, W., Battifora, H. (eds): In "Radiation Oncology, Rationale, Technique, Results" (5th ed); C.V. Mosby, St. Louis, pp 555-585, 1979.

Murray, C.G., Herson, J, Daly, T.E., Zimmerman, S.O.: Radiation necrosis of the mandible: A 10 years study. Part I. Factors influencing the onset of necrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 6: 543-548, 1980 [a].

Murray, C.G., Daly, T.E., Zimmerman, S.O.: The relationship between dental disease and radiation necrosis of the mandible. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.*, 49: 99-104, 1980 [b].

Nathanson, A.: Bony repair of defects in non-irradiated and irradiated mandibulas. An experimental study in rabbits. Thesis, University of Stockholm, Stockholm, 1977.

Nathanson, I.T.: Effect of gamma-ray of radium on wound healing. *Surg. Gynec. Obst.* 59: 62-69, 1934.

Nijweide, P.J., Scheven, B.A.A., Visser, J.W.M.: Proliferation and differentiation of osteoclast progenitor and precursor cells. In "Calcium Regulation and Bone Metabolism. Basic and Clinical Aspect" (D.V. Cohn, T.J. Martin, P.J. Meunier, eds); *Excerpta Medica*, Amsterdam, New York, Oxford, Vol. 9, pp 301-307, 1987.

Ormiston, M.C.E.: A study of rat intestinal wound healing in the presence of radiation injury. *Br. J. Surg.*, 72: 56-58, 1985.

Orton, C.G., Ellis, F.: A simplification in the use of the NSD concept in practical radiotherapy. *Br. J. Radiol.*, 46: 529-537, 1973.

Osdoby, P., Krudowski, M., Oursler, M.J., Salino-Hugg, T.: The origin, development and regulation of osteoclasts. *Bio Essays*, 1: 30-34, 1987.

Overgaard, M., Bentzen, S.M., Christensen, J.J., Madsen, H.E.: The Value of the NSD formula in equation of acute and late complications in normal tissue following 2 and 5 fractions per week in breast cancer patients treated with postmastectomy irradiation. *Radiother. Oncol.*, 9: 1-12, 1987.

Owen, M.: The origin of bone cells. *Int. Rev. Cytol.*, 28: 213-238, 1970.

Owen, M.: The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum.*, 23: 1073-1079, 1980.

Owen, M.: Bone cell differentiation. *Roy. Soc. Med. Int. Congr. Sympos. Series*, 55: 25-29, 1983.

Patt, H. M., Quastler, H.: Radiation effects on cell renewal and related systems. *Physiol. Rev.*, 43: 357-396, 1963.

Patt, H. M., Maloney, M. A.: Radiosensitivity of the process initiating bone marrow regeneration. *Radiat. Res.*, 41: 500-506, 1970.

Patterson, T.J.S., Berry, R.J., Wierenik, G.: The effect of X-irradiation on the survival of skin flaps of the pig. *Br. J. Plast. Surg.*, 25: 17-19, 1972.

Pelker, R.R., Friedlaender, G.E., Panjabi, M.M., Kapp, D., Doganis, A.: Radiation-induced alteration of fracture healing biomechanics. *J. Orthop. Res.*, 2: 90-96, 1984.

Piermattei, D.L., Greely, R.G., Matis, U., Schebitz, H.: Zugänge zum Skelettsystem von Hund und Katze. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 1975

Pitkänen, M.A., Hopewell, J.W.: Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. *Acta Radiol. Oncol.*, 22: 253-256, 1983.

Pitkänen, M.A., Hietanen, T.: Late radiation damage to the rat femur and the NSD formula. *Strahlentherapie*, 160: 394-397, 1984.

Pritchard, J.J.: The Osteoblast. In "The Biochemistry and Physiology of Bone" (G.H. Bourne ed [2nd ed]); Academic Press, New York, London, pp 21-40, 1972.

Puck, T.T., Marcus, P.I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 103: 653-666, 1956.

Regen, E.M., Wilkins, W.E.: The influence of roentgen irradiation on the rate of healing of fractures and the phosphatase activity of the callus of adult bone. *J. Bone Joint Surg.*, 18: 69-79, 1936.

Reinhold, H.S.: Late changes in the architecture of blood vessels of the brain after irradiation. *Brit. J. Radiol.*, 53: 693-696, 1980.

Revell, P.A.: Necrosis and healing in bone. In "Pathology of Bone" (P.A. Revell ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 203-234, 1986.

Rhineland, F.W.: Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 105: 34-81, 1974.

Rhineland, F.W., Baragry, R.A.: Microangiography in bone healing. I. Undisplaced closed fractures. J. Bone Joint. Surg., 44-A: 1273-1298, 1962.

Richany, S.F., Sprinz, H., Kraner, K., Ashby, J., Merrill, T.G.: The role of the diaphyseal medulla in the repair and regeneration of the femoral shaft in the adult cat. J. Bone Joint Surg., 47-A: 1565-1584, 1965

Riseborough, E., Grabias, S., Burton, R., Jaffe, N.: Skeletal alterations following irradiation for Wilm's tumor. J. Bone Joint Surg., 58-A: 526-536, 1976.

Robinson, D.W.: Surgical problems in the excision and repair of radiated tissue. Plast. Reconstr. Surg., 55: 41-48, 1975.

Rohrer, M.D., Young Kim, M.S., Fayos, J.V.: The effect of cobalt-60 irradiation on monkey mandibles. Oral Surg. Oral Med. Oral Path. 48: 424-440, 1979.

Romeis, B.: Mikroskopische Technik (16. Aufl.). R. Oldenbourg, München, 1968.

Rubin, P., Duthie, R.B., Young, L.W.: The significance of scoliosis in postirradiated Wilm's tumor and Neuroblastoma. Radiology, 79: 539-568, 1962.

Rubin P., Casarett G.W.: Growing cartilage and bone. In "Clinical Radiation Pathology" (P. Rubin, G.W. Casarett eds), W.B. Saunders, Philadelphia, pp 518-556, 1968 [a].

Rubin P., Casarett G.W.: Mature cartilage and bone. In "Clinical Radiation Pathology" (P. Rubin, G.W. Casarett eds), W.B. Saunders, Philadelphia, pp 557-608, 1968 [b].

Rudolph, R.: Complications of surgery for radiotherapy skin damage. *Plast. Reconstr. Surg.*, 70: 179-183, 1982.

Sams, A.: The effect of 2000 r of X-rays on the acid and alkaline phosphatase of mouse tibiae. *Int. J. Radiat. Biol.*, 10: 123-140, 1966.

Sarmiento, A., Schaeffer J.F., Beckerman L., Latta L.L., Enis, J.E.: Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J. Bone Joint Surg.*, 59-A: 369-375, 1977.

SAS Institute Inc.: SAS User's Guide: Statistics, 1982 edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1982.

Schebitz, H., Buschmann, H.: Wunde. In "Allgemeine Chirurgie für Tierärzte und Studierende" (H. Schebitz, W. Brass eds); Paul Parey Verlag, Berlin, pp 168-219, 1975.

Schenk, R., Willenegger, H.: Morphological findings in primary fracture healing. *Symposia Biologica Hungarica*, 8: 75-86, 1967.

Schlegel, D., Hilfrich, J., Klemm, H., Schreckenberger, H.: Knochenregeneration im Tierversuch nach Strahlenbelastung. *Electromedica*, 1: 26-28, 1972.

Schmid, R.: Experimentelle Untersuchungen über die Einwirkung von Röntgen -Vor und -Nachbestrahlung auf die Wundheilung. *Strahlentherapie*, 109: 609-619, 1958.

Sengupta, S., Prathap, K.: Radiation necrosis of the humerus. *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.* 12: 312-320, 1973.

Shamberger, R.: Effect of chemotherapy and radiotherapy on wound healing: Experimental studies. *Recent Res. Cancer Res.*, 98: 17-34, 1985.

Silverman, S., Chierici, G.: Radiation therapy of oral carcinoma. I. Effects on oral tissues and management of the periodontium. *J. Periodontol.*, 36: 478-484, 1965.

Singh, K.: Two regimes with the same TDF but differing morbidity used in the treatment of stage II carcinoma of the cervix. *Br. J. Radiol.*, 51: 357-362, 1978.

Stajic, J., Milovanovic, A.: Radiation and wound healing: Evolution of tensile strength in excised skin wound of irradiated rats. *Strahlentherapie*, 139: 87-90, 1970.

Stephenson, W.H., Cohen, L.: Post-irradiation fractures of the femur. *J. Bone Joint Surg.*, 38-B: 830-845, 1956.

Strandquist, M.: Studien über die kumulative Wirkung der Röntgenstrahlen bei Fraktionierung. *Acta Radiol. (Stockholm; Suppl.)*, 55: 1-300, 1944.

Suit, H.D.: Radiation biology: A basis for radiotherapy, in Fletcher, G.H. (ed): *Textbook of Radiotherapy* (2nd ed), Philadelphia, Lea and Febiger, pp 75-121, 1973

Suit, H.D., Proppe, K.H., Mankin, H.J., Wood, W. C.: Radiation therapy and conservative surgery for sarcoma of soft tissue. Prog. Clin. Cancer, 8: 311-318, 1982.

Tannock, I.F., Hayashi, S.: The proliferation of capillary endothelial cells. Cancer Res., 32: 77-82, 1972.

Thames, H.D., Withers, H.R.: Test of equal effect per fraction and estimation of initial clonogen number in microcolony assays of survival after fractionated irradiation, Br. J. Radiol., 53: 1071-1077, 1980.

Thames, H.D., Withers, H.R., Mason, K.A., Reid, B.O.: Dose-survival characteristics of mouse jejunal crypt cells. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 7: 1591-1597, 1981.

Thames, H.D., Withers, H.R., Peters, L.J.: Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation. Implications for dose-survival relationships. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 8: 219-226, 1982.

Thames, H.D., Rozell, M.E., Tucker, S.L., Ang, K.K., Travis, E.L.: Direct analysis of quantal radiation response data. Int. J. Radiat. Biol., 46: 999-1009, 1986.

Thames, H.D., Hendry, J.H.: Fractionation in radiotherapy. London, Taylor and Francis, 1987.

Thielemann, F.W., Alexa, M., Herr, G. und K. Schmidt: Matrix induced intramembranous osteogenesis. In "Current Advances in Skeletogenesis" (M. Silbermann and H.C.Slavkin ed); Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton, pp 406-411, 1982

Thompson, L.W., Bennett, J.E.: The influence of subcutaneous cobalt 60 irradiation on wound healing and tensile strength. Surgery, 172: 72-75, 1970.

Tonna, E.A., Cronkite, E.P.: Cellular responses to fracture studied with tritiated thymidine. J. Bone Joint Surg., 43-A: 352-362, 1961.

Tonna, E.A., Cronkite, E.P.: Changes in the skeletal cell proliferative response to trauma concomitant with ageing. J. Bone Joint Surg., 44-A: 1157- 1168, 1962.

Tonna, E.A., Cronkite, E.P.: Skeletal cell labeling following continuous infusion with tritiated thymidine. Lab. Invest., 19: 510-515, 1968.

Trott, K.-R.: Chronic damage after radiation therapy: Challenge to radiation biology. Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys., 10: 907-913, 1984.

Trott, K.-R., Kummermehr, J.: Strahlenwirkung auf die Haut. In "Handbuch der Medizinischen Radiologie" (L. Diethelm, F. Heuck, O. Olsson, F. Struad, H. Vieten, A. Zuppinger eds); Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Band XX, pp 171-204, 1985

Trueta, J.: The role of the vessels in osteogenesis. J. Bone Joint. Surg., 45-B: 402-418, 1963.

Tucker, S.L., Thames, H.D.: Flexure dose: The low dose limit of effective fractionation. Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys., 9: 1373-1383, 1983 [a].

Tucker, S.L., Withers, H.R., Mason, K.A., Thames, H.D.: A dose-surviving fraction curve for mouse colonic mucosa. Europ. J. Cancer Clin. Oncol., 19: 433, 1983 [b].

Tucker, S.L.: Tests for the fit of the linear-quadratic model to radiation isoeffect data. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10: 1933-1939, 1984.

Turesson, I., Notter, G.: The influence of fraction size in radiotherapy on the late normal tissue reaction - I: comparison of the effects of daily and once-a-week fractionation on human skin. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10: 593-598, 1984 [a].

Turesson, I., Notter, G.: The influence of fraction size in radiotherapy on the late normal tissue reaction - II: comparison of the effects of daily and twice-a-week fractionation on human skin. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10: 599-606, 1984 [b].

Ueberschär, K.J.: Tierexperimentelle Untersuchungen über Verlauf und Reparation der radiogenen Knochenschädigungen. Strahlentherapie, 110: 529-540, 1959.

Ullrich, R.L., Casarett, G.W.: Interrelationship between the early inflammatory response and subsequent fibrosis after radiation exposure. Radiat. Res., 72: 107-121, 1977.

Urist, M.R., Wallace, T.H., Adams T.: The function of fibrocartilaginous fracture callus. J. Bone Joint Surg., 47-B: 304-318, 1965.

Urist, M.R., McLean, F.C.: Osteogenic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J. Bone Joint Surg., 34-A: 443-476, 1952.

Van den Brenk, H.A.S., Orton, C., Stone, M., Kelly, H.: Effects of X-radiation on growth and function of the repair blastema (Granulation Tissue). Int. J. Radiat. Biol., 25: 1-19, 1974.

Van Der Kogel, A.J.: Radiation tolerance of the rat spinal cord: Time dose relationship. Radiology, 122: 505-509, 1977.

Wara, M.W., Phillips, T.L., Margolis, L.W., Smith, V.: Radiation pneumonitis: A new approach to the derivation of time-dose factors. Cancer, 32: 547-552, 1973.

Wellwood, J.M., Jackson B.T., Bates T.D.: Break-down of small-bowel anastomoses after pelvic radiotherapy. Annals Roy. Coll. Surg. Engl., 54: 306-308, 1974.

White, A., Hornsey, S.: Radiation damage to the rat spinal cord: The effect of single and fractionated dose of X-rays. Br. J. Radiol., 51: 515-523, 1978.

Wiernik, G., Patterson, T.J.S., Berry, R.J.: The effect of fractionated dose-patterns of X-irradiation on the survival of experimental skin flaps in the pig. Br. J. Radiol., 47: 343-345, 1974.

Williams, M.V., Denekamp, J.: Radiation induced renal damage in mice: influence of fraction size. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10: 885-894, 1984.

Williams, M.V., Denekamp, J., Fowler, J.F.: A review of α/β ratios for experimental tumors: Implications for clinical studies of altered fractionation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 11: 87-96, 1985.

Wilson, C.W.: The uptake of phosphorus 32 by the knee joint and tibia of six-week-old mice and the effect of X-rays upon it. Variation of uptake with time after a dose of 2000 R of 200 kV X-rays. Brit. J. Radiol., 29: 86-91, 1956.

Withers, H.R.: Isoeffect curves for various proliferative tissues in experimental animals. In "Proc. Conf. Time-Dose Relationships in Clinical Radiotherapy" (W.L. Caldwell, D.D. Tolbert, eds), Madison Printing and Publishing Co., Madison, pp 30-38, 1975.

Withers, H.R., Elkind, M.M.: Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. Int. J. Radiat. Biol., 17: 261-267, 1970.

Withers, H.R., Mason, K.A.: The kinetics of recovery in irradiated colonic mucosa of the mouse. Cancer, 34: 896-903, 1974.

Withers, H.R., Chu, A.M., Reid, B.O., Hussey, D.H.: Response of mouse jejunum to multifraction radiation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1: 41-52, 1975.

Withers, H.R., Thames, H.D., Flow, B.L., Mason, K.A., Hussey, D.H.: The relationship of acute to late skin injury in 2 and 5 fraction/week gamma-rays therapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 4: 595-601, 1978.

Withers, H.R., Thames, H.D., Peters, L.J.: Differences in the fractionation response of acute and late responding tissues. In "Progress in Radio-Oncology" (K.H. Karcher, H.D. Kogelnik, G. Reinartz eds), Raven Press, New York, vol. II, pp 287-296, 1982.

Woodard, H.Q.: Some effects of X-rays on bone. Clin. Orthop. Rel. Res., 9: 118-130, 1957.

Woodard, H.Q.: The influence of X-rays on the healing of fractures. Health Physics, 19: 791-799, 1970.

Young, C.M.A., Hopewell, J.W.: Functional and morphological changes in pig skin after single or fractionated doses of X rays. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 8: 1539-1547, 1982.

LEBENS LAUF

Name: MICHAEL ARNOLD
Geboren: 18.09.1955
Geburtsort: Saarbrücken, B. R. D.
Staatsangehörigkeit: Republik Österreich

Mutter: INGEBORG, geborene KRAUSS
Geboren: 09.02.1931
Geburtsort: Freiburg im Breisgau, B. R. D.

Vater: WINFRIED ARNOLD
Geboren: 10.09.1928
Geburtsort: Kufstein/Tyrol, Republik Österreich

WOHNSITZE IN DER B. R. D.:

Dudweiler	(Saarland)	1955-1957
Landsweiler-Reden	(Saarland)	1957-1964
Merchweiler	(Saarland)	1970-1975
München	(Bayern)	seit 1975

WOHNSITZE IN DEN VEREINIGTEN NIEDERLANDEN:

Schoorl	(Nord-Holland)	1964-1965
Alkmaar	(Nord-Holland)	1965-1967
Bergen	(Nord-Holland)	1967-1970

BESUCHTE SCHULEN:

Volksschule	
Landsweiler-Reden	1962-1964
Europäische Schule	
Bergen	1964-1970
Deutsch-Französisches Gymnasium	
Saarbrücken	1970-1975

HOCHSCHULREIFE:

abgeschlossen am Deutsch-Französischen Gymnasium
in Saarbrücken am 18.06.1975

HOCHSCHULSTUDIUM:

absolviert an der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität in München. Abge-
schlossen am 24.07.1982 mit bestandenem dritten
Abschnitt der tierärztlichen Prüfung

BESCHÄFTIGUNGSVERHÄLTNISSE

Von 01.01.1983 bis 31.08.1985 Doktorand der Ge-
sellschaft für Strahlen- und Umweltforschung,
Institut für Strahlenbiologie, 8042 Neuherberg.

Seit 01.09.1985 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Institut und Poliklinik für Strahlentherapie und
Radiologische Onkologie, Technischen Universität
München, Klinikum rechts der Isar.

